THE UNIVERSITY
OF ILLINOIS
LIBRARY

589.05
CE
~~Ser. 2a~~
v.95

NATURAL
HISTORY
BIOLOGY

Return this book on or before the *Latest Date* stamped below. A charge is made on all overdue books.

U. of I. Library

DEC 24 1938

JUN 4 - 1948

SEP 5 1969

14685-S

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

In Verbindung mit

Prof. Dr. R. Abel, Geh. Obermed.-Rat in Jena
Prof. Dr. M. Braun, Geh. Reg.-Rat in Königsberg
Prof. Dr. R. Pfeiffer, Geh. Med.-Rat in Breslau

herausgegeben von

Prof. Dr. O. Uhlworm, Geh. Reg.-Rat in Bamberg
Präsident Dr. A. Weber in Dresden
und
Prof. Dr. E. Gildemeister, Ober-Reg.-Rat, Berlin-Lichterfelde-W.

Erste Abteilung. 95. Band

Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde

Originale

Mit 45 Abbildungen im Text und 12 Tafeln

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1925

589.05
CE
v.95

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 95. Heft 1.

Ausgegeben am 15. Mai 1925.

Nachdruck verboten.

Das Ektoplasma der Bakterien.

III. und IV. Mitteilung: Morphologie und Aufbau des Ektoplasmas der grampositiven Bakterien.

Zugleich ein Beitrag zur Theorie der Beizenfärbung.

[Aus der Parasitologischen und Vergleichend-pathologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin (Direktor: Geheimrat Lubarsch).]

Von Dr. med. **M. Gutstein**-Berlin.

Mit 1 Tafel.

Inhaltsübersicht.

I. Morphologie des Ektoplasmas. Nachweis einer Innen- und Außenmembran des Ektoplasmas, durch 1. Tannin-Guineagrün; 2. Karbol-Phosphin-Guineagrün; 3. Ferrocyankalium-Viktoriablau-Tannin-Safranin.

II. Allgemeiner Aufbau des Ektoplasmas. 1. Nachweis einer basischen Substanz, durch: a) Pikrinsäure-Guineagrün, b) Phosphin-Guineagrün; 2. Nachweis eines sauren Körpers durch: a) Karbolfuchsin-Ferrocyankalium, b) Viktoriablau.

III. Spezieller Aufbau des Ektoplasmas. 1. Es enthält ein saures, gramfestes Lipoid, das an der gramnegtiaven Zelle mittels: a) Karbolfuchsin-Ferrocyankalium, b) Viktoriablau, c) Tannin-Gramsche Färbung nicht mehr nachweisbar ist. 2. Eine basische Grundsubstanz, nachweisbar nach Entfernung der Zellipoide durch: a) saure Farbstoffe (Pikrinsäure-Kongorot), b) Tannin-basischer Farbstoff.

IV. Theorie der Beizenfärbungen: 1. saure Beizen (Tannin, Phosphormolybdänsäure); 2. basische Beizen (Eisenchlorid, Alaun usw.).

V. Chemischer Bau der Sporenmembran: 1. basische Grundsubstanz, nachweisbar durch Guineagrün; 2. saures Lipoid, nachweisbar durch: a) Safranin und andere basische Farbstoffe, b) Gramsche Färbung.

VI. Zur Chemie des Ektolipoids der Hefezellen.

I. Morphologie.

Die in der 1. Mitteilung (1) mitgeteilte Tanninmethode stellt bei den grampositiven Bakterien eine schmale Membran dar, die scharf begrenzt ist und den Zelleib umgibt. Diese Membran umfaßt jedoch, wie spätere Untersuchungen ergeben haben, nicht das gesamte Ektoplasma. Wenigstens läßt sich besonders an den größeren Arten, z. B. der Hefezelle und Anthraxbakterien, durch andere Methoden eine viel breitere Hülle färberisch nachweisen. Um dies zu beweisen, und individuelle Schwankungen in der Größe der Hefe- und Bakterienzellen auszuschließen, wurden an den in gleicher Weise fixierten Ausstrichen folgende Versuche vorgenommen*):

1. Versuch. Ein Hefeausstrich wird 2 Min. mit Safranin gefärbt, mit Tannin (5proz.) 2 Min. nachbehandelt und mit Methylenblau $^1/_2$ Min. nachgefärbt: Der Zelleib ist rötlich und ist nach außen von einer schmalen, scharf begrenzten, blauen Membran umgeben (Fig. 1).

*) Sämtliche Farbstoffe wurden, soweit nicht eine andere Zusammensetzung angegeben ist, als 1proz. wässerige Lösungen verwendet.

595713

2. Versuch. Derselbe Hefeausstrich wird mit Karbolmethylenblau 2—3 Min. gefärbt, mit einer 30proz. Tanninlösung 5 Min. lang gebeizt und nach Wasserspülung 2 Min. mit Safranin nachgefärbt: Zelleib ist schwach blau gefärbt; zuweilen tritt der Nukleolus als kleines dunkelblaues Granulum, von einem hellen Hof umgeben, deutlich hervor. Die rote Ektoplasmahülle ist fast doppelt so breit wie im vorhergehenden Versuch (Fig. 2).

Auch an dem Anthraxbakterium läßt sich je nach der Färbe- und Fixationsmethode eine schmälere oder breitere Membran nachweisen.

3. Versuch. Ein Milzbrandbakterienausstrich, in gewöhnlicher Weise hitzefixiert, wird 2—3 Min. mit polychromer Methylenbaulösung gefärbt, abgespült, mit 5proz. Tannin 2 Min. nachbehandelt, abgespült und mit Safranin $^1/_2$ Min. nachgefärbt: Im schwachgefärbten Zelleib sind meist an den Polen dunkelviolette Granula sichtbar. Die äußere Membran ist schmal und rosa gefärbt. Ebenso ist die Membran der freiliegenden Sporen sowie die im Innern des Zelleibes befindlichen Sporen rosa gefärbt (Fig. 1a).

4. Versuch. Ein Milzbrandausstrich wird mit einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung fixiert, abgespült, mit Karbolmethylenblau 2—3 Min. gefärbt, nach Wasserspülen mit 5proz. Tannin gebeizt, abgespült und mit Safranin 2 Min. nachgefärbt. Der Zelleib ist blau gefärbt, zuweilen treten Granula auf, die Membran ist rot und breit und macht durchaus den Eindruck einer Kapsel (Fig. 2a).

Nach den Versuchen 1—4 zu urteilen, mußte man zu der Anschauung kommen, daß besonders bei der Hefezelle ein viel breiteres Ektoplasma vorhanden ist, als man nach der Tanninmethode, die in der ersten Mitteilung ausführlich beschrieben worden ist, annehmen sollte. Allerdings konnte man gegen diese Versuche den berechtigten Einwand machen, daß der hier hervortretende viel breitere Ektoplasmaring nicht präexistiert, sondern vielmehr durch die konzentrierte Tanninlösung künstlich verbreitet worden ist. Von der Unrichtigkeit dieser Vermutung kann man sich aber mit Leichtigkeit durch folgende Versuche überzeugen:

5. Versuch. Uebergießt man einen Hefeausstrich mit Lugolscher Lösung und mikroskopiert unter einem Deckgläschen, so erscheint die braungelb gefärbte Hefezelle von einem hellen, scharf begrenzten breiten Ring umgeben, und zwar ist dieser Ektoplasmaring ebenso breit wie im Versuch 2.

6. Versuch. Bringt man auf einen fixierten Hefeausstrich einen Tropfen Glyzerin, legt ein Deckgläschen darauf und mikroskopiert bei starker Vergrößerung, so erscheint die ungefärbte Hefezelle ebenfalls von einer hellen, ziemlich breiten Ektoplasmamembran umgeben.

Mittels der nachstehenden Färbemethoden läßt sich nun nachweisen, daß das Ektoplasma der Hefezelle aus zwei Schichten besteht, und zwar einer dicken inneren, scharf begrenzten Membran und einer äußeren, unscharf begrenzten, zarten Außenschicht.

1. Tannin-Guineagrün-Methode.

7. Versuch. Behandelt man einen fixierten Hefeausstrich 5 Min. mit 30proz. Tannin, spült mit Wasser ab und färbt darauf 1—2 Min. mit Guineagrün nach, so erscheint der Zelleib wenig oder schwach grünlich gefärbt, die Innenmembran des Ektoplasmas ist dunkelgrün und setzt sich nach außen in eine hellgrüne Außenmembran fort (Fig. 4).

2. Karbolphosphin-Guineagrün-Methode.

Diese Methode gestattet, ohne Verwendung einer Vorbeize den Leib in gelber und die Doppelmembran des Ektoplasmas in grüner Farbe darzustellen.

8. Versuch. Ein fixierter Hefeausstrich wird 5 Min. mit Karbolphosphin (geringer Zusatz von 5proz. Karbolwasser zu 1proz. Phosphinlösung) gefärbt, abge-

589.05
CE
N.H.L.
Ser 7a
V.95

spült und $^1/_4$—$^1/_2$ Min. mit Guineagrün nachgefärbt: Der Zelleib ist gelb, die Innenmembran dunkelgrün, die Außenmembran hellgrün gefärbt (Fig. 3).

3. Ferrocyankalium-Viktoriablau-Tannin-Safranin-Methode.

Mittels dieser Methode lassen sich die beiden Schichten des Ektoplasmas in 2 verschiedenen Kontrastfarben zur Darstellung bringen.

9. Versuch. Ein fixierter Hefeausstrich wird 5 Min. lang mit einer 2—10proz. Lösung von gelbem Blutlaugensalz (Ferrocyankalium) behandelt, mit Wasser abgespült, mit Viktoriablau 2—3 Min. nachgefärbt, abgespült, mit einer 30proz. Tanninlösung 5 Min. gebeizt, wiederum abgespült und $^1/_4$ Min. mit Safranin nachgefärbt: Der Leib der Hefezelle erscheint schwach bläulich gefärbt, die Innenmembran stellt eine dunkelblaue, scharf begrenzte Linie dar, die nach außen in eine rötliche Außenschicht übergeht (Fig. 5).

Bei den viel kleineren Bakterien und Kokken ist der Nachweis der doppelten Ektoplasmamembran ziemlich schwierig; doch gelingt es zuweilen z. B. beim Anthraxbakterium, mit Guineagrün die Innen- und Außenmembran zu färben.

Wenn man die bisher beschriebenen Methoden zum Nachweis des Ektoplasmas der grampositiven Bakterien überblickt, so sind sie zwar in praktischer Beziehung von großer Bedeutung, indem sie morphologisch den sicheren Nachweis gestatten, daß jedes Bakterium eine äußere Schutzhülle besitzt, die sich nach diesen Methoden isoliert oder in eine Kontrastfarbe zum Zelleib färben lassen. Insbesondere gibt die in der ersten Mitteilung beschriebene Methode mittels Vorbehandlung mit 5proz. Tannin und Nachfärbung mit basischen Farbstoffen (1proz. wässerige Lösungen) sehr einwandfreie und sichere Resultate. Der eigentlichen Aufgabe, den chemischen Aufbau des Ektoplasmas zu erforschen, entsprechen jedoch die erwähnten Färbemethoden in keiner Weise. Die der eigentlichen Färbung vorausgehende Behandlung der Mikroben mit einer Beize verändern die ursprünglichen Eigenschaften der Substrate derartig, daß aus der nachfolgenden Färbung keine bindenden Schlüsse auf die chemische Natur der gefärbten Gewebsbestandteile gezogen werden können. Dies ist der Nachteil aller adjektiven Färbungen überhaupt. Zur Erkennung des chemischen Baues des Ektoplasmas war es daher notwendig, Methoden ausfindig zu machen, die die Bakterienmembran substantiv, ohne Zuhilfenahme einer Beize anfärben. Nun gibt es allerdings eine Reihe von Färbemethoden, die nicht bloß den Zelleib, sondern auch seine äußere Membran mitfärben, z. B. bei der Gramschen Methode, bei der Färbung mit Karbolfuchsin, Karbolsafranin, Karbolmethylenblau, Karbolmethylviolett, bei denen die Bakterien infolge Mitfärbung des Ektoplasmas viel größer erscheinen als z. B. bei der Färbung mit Löfflers Methylenblau. Zweifelsohne haben manche frühere Untersucher durch verschiedene Methoden das Ektoplasma mitgefärbt, ohne jedoch dessen eigentliche Bedeutung erkannt zu haben. Wenn auch in diesen Fällen die Zelle viel größer erscheint (als bei der Färbung des bloßen Zelleibes), so kann man aus solchen etwas subjektiven Größenunterschieden den Nachweis des Ektoplasmas nicht herleiten. Einwandfrei ist dieser Nachweis nur dann zu erbringen, wenn es gelingt, das Ektoplasma entweder isoliert zu färben und zwar ohne Färbung des Zelleibes oder bei gleichzeitiger Darstellung des letzteren in einer Kontrastfarbe.

II. Allgemeiner Aufbau des Ektoplasmas.

In den nachfolgenden Untersuchungen über den chemischen Aufbau des Ektoplasmas spielt die substantive Färbung mit basischen oder sauren Farbstoffen eine sehr wichtige und entscheidende Rolle. Insbesondere wird aus der Tatsache, daß ein Substrat — hier das Ektoplasma — sich mit einem basischen oder sauren Farbstoff substantiv färben läßt, der Schluß gefolgert, daß dieses eine saure bzw. eine basische Substanz enthalten müsse. Diese Schlußfolgerung ist aber begreiflicherweise nur dann berechtigt, wenn man in jedem Färbeprozeß einen chemischen Vorgang erblickt, wie es seitens der Anhänger der chemischen Theorie der Zell- und Bakterienfärbung geschieht. Faßt man dagegen den Färbeprozeß als einen physikalischen Vorgang auf, so gestattet die substantive Färbung eines Substrates mit bestimmten Farbstoffen höchstens einen Schluß auf dessen physikalischen Bau, nicht aber auf seine chemische Zusammensetzung.

Mit Rücksicht auf die große Bedeutung, die die Auffassung vom Wesen der histologischen Färbung für die in Frage stehende Untersuchung hat, erscheint es dringend geboten, einige Bemerkungen über diesen Gegenstand vorauszuschicken. Unserer festen Ueberzeugung nach ist jede histologische Färbung, wenn sie der Differenzierung mit indifferenten Lösungsmitteln (Wasser, Alkohol) und erst recht, wenn sie einer Differenzierung mit differenten Lösungsmitteln (Säuren, Salzsäure-Alkohol usw.) widersteht, eine echte chemische Verbindung des Farbstoffs mit einem chemisch entgegengesetzten Substratbestandteil. Es wird nicht bestritten, was durchaus wahrscheinlich ist, daß die Aufnahme eines Farbstoffes durch irgendein Gewebe oder Bakterium von seiner Difusionsfähigkeit abhängig ist, d. h. von der Möglichkeit, die äußere Membran der Zelle zu durchdringen und den Leib zu färben. Wenn demnach ein bestimmter Farbstoff von einer Zelle nicht aufgenommen wird, so kann dies durch seine geringe Diffusionsfähigkeit bedingt sein. Mit andern Worten: dieser betreffende Farbstoff hat infolge der geringen Permaeabilität des Gewebes für den schwer diffusiblen Farbstoff nicht die Vorbedingungen, um mit einem chemisch entgegengesetzten Bestandteil des Substrates eine Bindung, und zwar chemischer Natur, einzugehen. Fällt aber eine Färbung positiv aus, so ist damit sicher bewiesen, daß in den betreffenden Geweben ein Bestandteil enthalten ist, der chemisch entgegengesetzte Eigenschaften wie der verwandte Farbstoff besitzt.

Auf die zahlreichen Untersuchungen von Jaquemin Knecht, Suida, Bechold, Matthew und M. Heidenhain, die sehr wichtige Beweise für die chemische Natur des Färbeprozesses erbracht haben, werde ich hier um so weniger eingehen, als sie in der Publikation von Eisenberg (2) ausführlich dargelegt worden sind. Dagegen muß ich mich etwas eingehender mit den Einwänden beschäftigen, die gegen die chemische Theorie der Färbung gemacht worden sind. Der stärkste und stichhaltigste Vorwurf, der gegen diese Theorie erhoben worden ist, ist die Tatsache, daß die histologischen Substrate zum allergrößten Teil sowohl basische als auch saure Farbstoffe aufnehmen können, d. h. amphophil sind. Die Erklärung für diese auf den ersten Blick befremdliche Tatsache hat Unna gegeben, und zwar durch Schöpfung seiner genialen Chromolyse. Unna geht von der sehr einleuchtenden Vorstellung aus, daß die meisten Gewebe aus zwei oder mehreren Substanzen bestehen, die zum Teil sauren, zum Teil basischen

Charakters und chemisch aneinander gebunden sind. Bei der Färbung eines Gewebes mit sauren Farbstoffen färbe sich der basische und nur dieser Bestandteil, während bei der Färbung desselben Gewebes mit basischen Farbstoffen sein saurer und nur dieser Bestandteil gefärbt wird. Auf dem Gehalt der meisten Gewebe und Bakterien an sauren und basischen Substanzen beruhe ihre Amphophilie. Wenn man den sehr komplizierten Bau der meisten histologischen Substrate bedenkt, hat diese Erklärung Unnas nichts Befremdendes an sich.

Einen einwandfreien Beweis, daß die histologische Färbung nur auf den chemischen Eigenschaften des Substrates und nicht im geringsten auf dessen physikalischem Bau beruht, hat zuerst Unna (3) durch die Isolierung der Zytose gegeben. Diese Zytose, die Unna auf Grund ihrer Löslichkeitsverhältnisse als saure Zellalbumose charakterisieren konnte, färbt sich mit Karbol-Methylgrün-Pyronin (Unna-Pappenheimsche Lösung) im Gegensatz zu dem grünen Kerne rot, nimmt also das basische Pyronin auf. Dieselben Eigenschaften zeigt die Zytose nach Unna auch dann, wenn man sie aus den Zellen durch geeignete Lösungsmittel extrahiert und unter mikroskopische Verhältnisse gebracht hat, indem sie aus der Unna-Pappenheimschen Lösung nur das rote Pyronin aufnimmt.

Ein 2. gewichtiger Einwand gegen die chemische Theorie der Zellfärbung ist das Fehlen von stöchiometrischen Beziehungen zwischen Farbstoff und Substrat, wie es für eine chemische Verbindung erwartet werden müßte. Dieser Einwand kann m. E. nicht als stichhaltig bezeichnet werden. Wenn man sich nämlich vor Augen führt, daß in den histologischen Substraten die sauren und basischen Bestandteile nicht frei vorkommen, sondern vielmehr chemisch aneinander gebunden sind, so kann nicht erwartet werden, daß z. B. bei Färbung mit einem basischen Farbstoff dieselben Bedingungen vorliegen sollten, wie wenn die sauern Gewebsbestandteile frei und in Lösung sich befänden. Nur in letzterem Falle müßten gesetzmäßige Beziehungen zwischen der Quantität des aufgenommenen Farbstoffes und den sauren Gewebsbestandteilen existieren.

Wenn man ferner gegen die chemische Färbetheorie eingewandt hat, daß manche Substrate, z. B. die neutrophilen Granulationen der weißen Blutzellen, sich mit neutralen Farbstoffen färben lassen (eosinsaurem Methylenblau), die ja keine freien chemischen Affinitäten mehr besitzen, um eine Bindung mit dem Gewebe einzugehen, so ist darauf zu erwidern, daß solche Gewebsbestandteile nicht etwa den für gewöhnlich wasserunlöslichen neutralen Farbstoff als Ganzes aufnehmen, sondern vielmehr dient in diesen Farbgemischen der saure Farbstoff gar nicht als Färbemittel, sondern als Beize für den basischen Farbstoff. Dies hat z. B. Unna (4) einwandfrei für die Färbung nach Giemsa (Romanowsky) nachgewiesen. Die Aufnahme des neutralen Farbstoffes beruht in diesem Falle also auf einer Tripelverbindung: basische Gewebssubstanz — saurer Farbstoff — basischer Farbstoff, indem ein basischer Gewebsbestandteil zunächst den sauren Farbstoff Eosin aufnimmt, und dieser wiederum mit dem basischen Farbstoff Thiazinrot eine chemische Bindung eingeht. Bei der Färbung mit neutralen Farbstoffen ist übrigens theoretisch auch eine andere Tripelverbindung denkbar, nämlich: saurer Gewebsbestandteil — basischer Farbstoff und saurer Farbstoff, wo

dann der basische Farbstoff als Beize für die Bindung eines sauren Farbstoffes an ein saures Substrat fungieren würde. Solche färberische Prozesse scheinen nach meinen Untersuchungen auch tatsächlich bei der histologischen Färbung möglich zu sein.

Auch die Tatsache, daß ein Zusatz von Säuren zu sauren Farbstofflösungen und Alkali zu Lösungen basischer Farbstoffe eine farbverstärkende Wirkung ausüben, vermag m. E. die chemische Theorie der Zellfärbung zu erklären. In diesen Fällen wird nämlich durch Säuren bzw. Basen die betreffende Farbsäure, bzw. Farbbase in Freiheit gesetzt (abgespalten). Da letztere im Wasser schwerer löslich ist, so wird dadurch die chemische Bindung an die entgegengesetzt beschaffenen Gewebsbestandteile beschleunigt (Unnas Schwebefällung).

Schließlich muß ich noch auf einen wichtigen Einwand gegen die chemische Theorie eingehen, nämlich die Tatsache, daß die chemisch indifferenten Zellulose und Baumwolle mit einer Reihe von Farbstoffen sich färben lassen. In diesen Fällen, so meinen die Anhänger der physikalischen Theorie mit Recht, kann eine chemische Verbindung zwischen Farbstoff und Substrat unmöglich stattfinden. Es ist ein großes Verdienst von Leonor Michaelis (5), die Theorie der Zellulose- und Baumwollfärbung aufgeklärt zu haben. Michaelis konnte nämlich nachweisen, daß bei der Färbung von reinem Filtrierpapier (Zellulose) mit Methylenblau (d. h. mit einer Lösung von Methylenblauchlorid) überhaupt kein Chlor, sondern nur die Methylenblaubase allein von dem Papier aufgenommen wird. In der Farbflotte läßt sich das Chlor nachweisen, und zwar nicht als freie Salzsäure, sondern als neutrales Chlorid. Dieser auffällige Befund läßt keine andere Deutung zu, als daß hier ein chemischer Austausch von Ionen stattgefunden hat, „und da eine solche bei Zellulose ausgeschlossen ist, kann nur die in jeder Zellulose immer noch vorhandene Asche daran schuld sein. In der Tat ist es auf keine Weise möglich, Zellulose völlig von Kieselsäure und Kalk zu befreien. Die besten aschefreien Filter enthalten immer noch mindestens ein Zehntel Milligramm dieser Asche auf ein Filter gewöhnlicher Größe, meist aber viel mehr, und diese Mengen sind in der Tat ausreichend, um die gesamte Bindungsfähigkeit des Filters für Methylenblau zu erklären, sobald man die berechtigte Annahme macht, daß die Silikate die Zellulosefasern in dünnster Schicht überall bedecken." Mit Recht hebt Michaelis hervor, „daß alle Schwierigkeiten, die uns früher die Färbung der Zellulose machten, dadurch belanglos geworden sind, und die Färbung der Zellulose nicht mehr als einen Gegenbeweis gegen die chemische Natur der Färbung der Eiweißkörper benutzt werden kann".

Nach den vorausgeschickten Bemerkungen über die chemische Theorie der Zellfärbung kann nun gezeigt werden, daß das Ektoplasma der grampositiven Bakterien eine basische und eine saure Substanz enthalten müsse, da es sich einerseits mit sauren, andererseits mit basischen Farbstoffen isoliert nachweisen läßt, und zwar ohne Zuhilfenahme einer Beize.

Von den von uns untersuchten sauren Farbstoffen hat sich das Guineagrün (Kahlbaum) als sehr geeignet erwiesen zur Färbung des Ektoplasmas, da es anscheinend eine große Verwandtschaft zum basischen Körper desselben hat. Die Erklärung für diese Tatsache scheint mir darin zu liegen, daß das Guineagrün sehr leicht in die

Bakterienzelle eindringt. Wenigstens läßt sich die starke Permeabilität der Zelle für Guineagrün daraus schließen, daß es leicht gelingt, die nicht vorbehandelten Bakterien und Hefezellen mit einer wässerigen Lösung dieses Farbstoffes anzufärben, während andere saure Farbstoffe hitzefixierte Zellen bekanntlich nicht färben, es sei denn, daß der Farbflotte eine Säure (Essigsäure, Salzsäure) zugesetzt wird. Mit dem sauren Guineagrün läßt sich, wie gesagt, die basische Substanz des Ektoplasmas isoliert färben.

1. Pikrinsäure-Guineagrün-Methode.

Ein hitzefixierter Hefeausstrich wird mit einer gesättigten Lösung von Pikrinsäure, der etwa $^1/_2$—1proz. Essig- oder Salzsäure hinzugesetzt ist (ohne Säurezusatz ist eine Färbung nicht möglich!), 5—10 Min. gefärbt, mit Wasser abgespült und mit Guineagrün kurz nachgefärbt (5—10 Sek.).

Mikroskopisch erscheint der Zelleib gelb gefärbt, von einer schmalen grünen Membran umgeben (Fig. 6).

Bei den kleineren Bakterien (Milzbrand, Staphylococcus usw.) läßt sich mit dieser Methode keine Doppelfärbung erzielen, wohl aber bei Vorfärbung des Zelleibes mit Phosphin.

2. Phosphin-Guineagrün-Methode.

Die hitzefixierten Bakterienausstriche (Hefe, Milzbrand, Staphylococcus) werden mit Phosphin 5 Min. gefärbt, mit Wasser abgespült und mit Guineagrün $^1/_4$—$^1/_2$ Min. nachgefärbt: Der Zelleib ist gelb, das Ektoplsama grün gefärbt. Sehr gut kommen beim Staphylococcus die Teilungslinien in grüner Farbe zum Vorschein. Bei dem Anthraxbakterium tritt oft neben der dunklen Innenmembran eine hellgrüne Außenschicht hervor (Fig. 7).

Größere Schwierigkeiten bereitete der Nachweis des sauren Körpers im Ektoplasma, da es im allgemeinen nicht gelingt, dieses mit basischen Farbstoffen isoliert zu färben. Doch haben die nachstehenden Methoden zum Ziele geführt.

3. Karbolfuchsin-Ferrozyankalium-Methode.

Nach dieser Methode gelingt es bei der Hefezelle, den Leib in roter Farbe und das Ektoplasma in violetter darzustellen. Diese Methode beruht darauf, daß Karbolfuchsin wie auch andere Karbolfarbstofflösungen das Ektoplasma mitfärben, wie ich bereits oben erwähnt habe. Durch die nachfolgende Behandlung mit rotem oder gelbem Blutlaugensalz wird nun das vorher nicht einwandfrei hervortretende Ektoplasma violett gefärbt und tritt dadurch in einen Kontrast zum roten Zelleib. Die violette Farbe scheint darauf zu beruhen, daß das Fuchsin durch Blutlaugensalz in eine violette Verbindung übergeführt wird (Oxydation?). Bringt man nämlich in ein Reagenzglas etwas Fuchsinlösung und fügt eine Lösung von rotem Blutlaugensalz, gelbem Blutlaugensalz, Eisenchlorid oder Formalin hinzu, so wird das Fuchsin violett gefärbt. Bei dieser Methode wird zur Darstellung des Ektoplasmas zwar auch eine Beize (Kaliumferrozyanat) verwandt, doch ändert dies an der Tatsache nichts, daß hier die Zellenmembran durch das basische Fuchsin gefärbt wird, da die Beize erst nach vorausgegangener Färbung zur Verwendung gelangt.

Technik. Ein hitzefixierter Hefeausstrich wird ca. 2—5 Min. mit Ziehlscher Lösung gefärbt, mit Wasser abgespült und mit einer 10proz. Lösung von gelbem Blutlaugensalz 10—15 Min. nachbehandelt, abgespült und getrocknet: Die Hefezellen erscheinen rot gefärbt, von einem scharf begrenzten Ring umgeben (Fig. 9).

An den kleinen Bakterien führt die Methode nicht zum Ziel.

Gegen die Karbolfuchsin-Ferrozyankalium-Methode zum Nachweis der sauren Substanz des Ektoplasmas kann immerhin der Einwand gemacht werden, daß in der Ziehlschen Lösung der Karbolzusatz als Beize fungiere, und daß deswegen hierbei eine substantive Färbung nicht vorliege. Diesen Einwand vermeidet die nächste Methode, bei der das Ektoplasma mit einer wässerigen Lösung eines basischen Farbstoffes isoliert gefärbt wird.

4. Viktoriablau-Methode.

Bei dieser Methode werden die Bakterienausstriche (Hefe, Anthrax, Milzbrand, Pneumokokkus) mit 10—25proz. Salzsäure (Ac. mur. conc. 10—25,0, Aq. dest. ad 100) 24 Std. vorbehandelt, wodurch die sauren Nucleoproteide der Zellen entfernt werden. Bei der Nachfärbung mit Viktoriablau erscheint der Zelleib schwach bläulich gefärbt, von einer scharf begrenzten blauen Membran umgeben. Dieses Darstellungsverfahren zeigt gleichzeitig, daß die saure Substanz des Ektoplasma in verdünnter Salzsäure unlöslich, also auch kein Nucleoproteid sein kann. Ueberhaupt wird das Ektoplasma durch diese Vorbehandlung nicht angegriffen, da es sich noch mit Guineagrün oder mit Tannin (Nachfärbung mit basischen Farbstoffen) färberisch sichtbar machen läßt.

Technik. Die hitzefixierten Hefeausstriche werden in eine Kuvette mit 10- bis 20proz. Salzsäure gestellt, wo sie 24 Std. bei gewöhnlicher Temperatur verbleiben. Nach dem Herausnehmen werden sie zur Entfernung der Salzsäurereste gründlich mit Leitungswasser abgespült, ca. $^1/_4$ Min. mit Viktoriablau gefärbt, abgespült und getrocknet. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigt der Zelleib nur eine schwache bläuliche Färbung, während die Bakterienmembran dunkelblau gefärbt ist (Fig. 10, 11, 12).

Auch die Sporenmembran der Milzbrandbakterien erscheint hierbei blau tingiert.

Da Viktoriablau ein basischer Farbstoff ist, so ist hiermit auf Grund der chemischen Theorie des Färbeprozesses im Ektoplasma eine saure Substanz nachgewiesen. Auf diesem sauren Körper dürfte auch die Gramsche Färbung beruhen. Wie nämlich in der vorausgegangenen Mitteilung (6) nachgewiesen werden konnte, ist das Ektoplasma der Grampositiven gramfest, andererseits erfolgte ja bei der Gramschen Methode die Färbung mit einem basischen Farbstoff (Gentianaviolett). Die der Färbung nachfolgende Behandlung mit Lugolscher Lösung ändert nichts an der Tatsache, daß hierbei das Ektoplasma durch den basischen Farbstoff gefärbt wird. Wir dürfen danach wenigstens vermuten, daß die gramfeste Substanz des Ektoplasmas identisch ist mit demjenigen sauren Körper, der nach der Karbolfuchsin-Ferrozyankalium- und Viktoriablau-Methoden nachgewiesen werden kann.

III. Spezielle Mikrochemie des Ektoplasmas.

Mit dem Nachweis des sauren und basischen Körpers in der Membran der grampositiven Bakterien ist natürlich die mikrochemische Analyse nicht erschöpft. Diese Aufgabe kann nur dann als gelöst betrachtet werden, wenn es gelingt, diese Substanzen chemisch näher zu charakterisieren. Wenn man bedenkt, daß die Bakterienmembran sicherlich eine bedeutende Rolle für die normale Funktion der Mikroben (Erhaltung der äußeren Form, Regelung des Gaswechsels, elektive Auf-

nahme bestimmter Nährstoffe usw.) spielt, so konnte vermutet werden, daß sie aus einer sehr widerstandsfähigen Substanz bestehen müsse. Ein solcher widerstandsfähiger Körper ist z. B. die Zellulose. Die Annahme, daß die Bakterienmembran Zellulose enthielte, lag deshalb im Bereich der Möglichkeit, als tatsächlich Zellulose bei einzelnen Mikroben makrochemisch nachgewiesen worden ist (vergl. K. B. Lehmann, Atlas und Grundriß der Bakteriologie, Bd. II, S. 18, bei Bacterium xylinum und B. subtilis).

Diese Vermutung erwies sich jedoch als nicht zutreffend: mit dem bekannten empfindlichen Reagens auf Zellulose (Blaufärbung durch Lugolsche Lösung und Schwefelsäure) läßt sich eine Blaufärbung des Ektoplasmas nicht erzielen:

Uebergießt man einen Hefeausstrich mit Lugolscher Lösung, mikroskopiert unter einem Deckgläschen und läßt vom Rande her konzentrierte Schwefelsäure zufließen, so erscheint der Zelleib dunkelbraun, während das Ektoplasma unsichtbar bleibt.

Auch bei Aenderung der Versuchsbedingungen, z. B. Vorbehandlung mit Lugolscher Lösung und Nachbehandlung mit Schwefelsäure oder in umgekehrter Reihenfolge, läßt sich bei der Hefezelle eine Blaufärbung des Ektoplasmas nicht erzielen.

Konnte also auf Grund dieser Versuche das Vorhandensein von Zellulose in der Zellenmembran als unwahrscheinlich bezeichnet werden, so mußte noch die Frage erhoben werden, ob hier event. ein höheres Kohlenhydrat vorliegt, das durch Jod und Schwefelsäure nicht blau gefärbt wird (Lignin, Dextran, Pentosane). An diese Möglichkeit mußte um so mehr gedacht werden, als Toennissen (7) in der Kapsel des Bacterium Friedländer Galaktan nachgewiesen haben will, das bei der Spaltung als Galaktose identifiziert werden konnte, und allgemein und mit Recht angenommen wird, daß die Schleimhülle mancher Bakterien aus dem Ektoplasma hervorgehe. Enthielte aber die Bakterienmembran der Grampositiven ein höheres Kohlenhydrat, so mußte es bei der Hydrolyse mit Salzsäure durch seine Reduktionswirkung makrochemisch nachgewiesen werden können. (Positive Trommersche Probe, Entfärbung der Fehlingschen Lösung, event. Pentoseprobe.) Sollte aber eine event. auftretende Reduktionswirkung nach Hydrolyse der Bakterien mit Salzsäure das Vorhandensein eines Kohlenhydrates im Ektoplasma beweisen, so mußten zuvor aus dem Zelleib diejenigen Substanzen entfernt werden, die ebenfalls bei der Spaltung eine Reduktion geben. Nun enthalten die Nukleoproteide des Bakterienleibes, und zwar ihr Nukleinsäurebestandteil bekanntlich ein Kohlenhydrat. Hydrolysiert man demnach Hefe mit verdünnter Salzsäure in der Hitze, so gibt das Filtrat eine positive Trommersche Probe [vgl. 2. Mitteilung (6), Vers. 8]. Zur Entscheidung der Frage, ob das Ektoplasma der Hefezellen ebenfalls ein Kohlehydrat enthielte, wurde deshalb Hefe zur Entfernung der Nukleoproteide bei gewöhnlicher Temperatur mit 25proz. Salzsäure behandelt. Nach dieser Vorbehandlung ist das Ektoplasma noch völlig intakt und läßt sich sowohl mit basischen als auch mit sauren Farbstoffen nachweisen. Wenn nun das Ektoplasma auch ein Kohlehydrat enthielte, so müßte es an den so vorbehandelten Hefezellen nunmehr durch Hydrolyse mit Salzsäure in der Hitze durch eine Reduktionswirkung sich nachweisen lassen. Zur Entscheidung dieser Frage wurde deshalb an der Hefe, die ja in beliebigen Mengen zur Verfügung steht, folgender Versuch ausgeführt:

25 g Hefe werden im Mörser mit 25proz. Salzsäure fein zerrieben und in 250 ccm dieser Lösung suspendiert und 24—48 Std. im Schüttelapparat behandelt. Die Lösung wird filtriert, und vom Sediment werden Ausstriche hergestellt und mit Methylenblau gefärbt: keine Färbung. (Entfernung der Nukleoproteide!) Ein Teil des Sediments wird

a) mit 5proz. Salzsäure verrieben und mehrere Stunden gekocht: das Filtrat gibt, mit Natronlauge alkalisch gemacht und mit Kupfervitriol versetzt und gekocht, keine Gelbfärbung;

b) mit 30proz. Salzsäure versetzt und 3—4 Std. im Autoklaven erhitzt. Es tritt ein anscheinend kristallinisches Sediment auf. Auch in diesem Versuch gibt das Filtrat eine völlig negative Trommersche Probe und entfärbt Fehlingsche Lösung nicht.

Aus diesen Versuchen darf geschlossen werden, daß das Ektoplasma der Hefezellen kein Kohlehydrat enthält. Allerdings besagt dieser negative Befund nicht viel über den Bau des Ektoplasmas. Aufschluß über den mikrochemischen Bau der Bakterienmembran der Grampositiven brachten jedoch die Untersuchungen über die Natur der Gramschen Färbung. Wie oben bereits ausgeführt wurde, ist 1) das Ektoplasma der Grampositiven gramfest, und 2) beruht die Gramfestigkeit dieser Mikroben auf der sauren Substanz des Ektoplasmas. Andererseits konnte ich auf dem 10. Kongreß der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie (8) (12.—14. Juni 1924) zeigen, daß man die stark grampositive Hefe ihrer Gramfestigkeit völlig berauben kann, wenn man sie kurze Zeit mit verdünnter heißer Salzsäure vorbehandelt und darauf einer Extraktion mit Alkohol unterwirft. Da nun die Alkoholextraktion die mit verdünnter heißer Salzsäure vorbehandelte, aber noch grampositive Hefe völlig gramnegativ macht, so beweist dieser Versuch eindeutig, daß die gramfeste Substanz der Hefezellen in Alkohol löslich, also ein Lipoid sein muß.

Unabhängig hiervon hat Schumacher (9) auf demselben Kongreß mitgeteilt, daß es ihm gelungen sei, aus der Hefe ein Lipoid makrochemisch darzustellen, das sich nach Färbung mit der Gramschen Methode als gramfest erwies.

Demnach muß das Ektoplasma der Grampositiven dieses gramfeste Lipoid enthalten, das seiner chemischen Natur nach nur ein saurer Körper sein kann, da er sich bei der Gramschen Färbung mit dem basischen Farbstoff Gentianaviolett färbt. Es läßt sich aber weiter beweisen, daß dieses gramfeste Lipoid der einzige saure Körper ist, der im Ektoplasma enthalten ist. Enthielte nämlich das Ektoplasma noch eine andere saure Substanz, so müßte es möglich sein, an der künstlich gramnegativ gemachten Hefezelle, aus der das gramfeste Lipoid entfernt ist, die Bakterienmembran mit basischem Farbstoff noch nachzuweisen, was aber nicht der Fall ist, wie folgende Versuche zeigen.

150 g Hefe werden mit 200 ccm 2proz. Salzsäure fein zerrieben, weitere 550 ccm derselben Lösung hinzugefügt und in einem großen Kolben 20 Min. lang gekocht und filtriert. Im Filtrat fallen nach Neutralisieren mit Ammoniak oder Kalilauge die gelösten Nukleoproteide aus. Das Sediment wird mit 200 ccm absol. Alkohol aufgenommen, fein zerrieben und 24—48 Std. im Schüttelapparat behandelt. Aus dem sich absetzenden Sediment werden Objektträgerausstriche hergestellt, die zur Entfernung der letzten Lipoidreste nochmals in einer Kuvette mit absol. Alkohol nachbehandelt werden. Färbt man diese Ausstriche

1) nach Gram und behandelt nach der Differenzierung mit Alkohol mit Eosin nach, so sind die Hefezellen rosa gefärbt; nur ein kleines Mikrogranulum — der Nucleolus — ist oft von einem hellen ungefärbten Hof umgeben, noch violett gefärbt. Außerdem sieht man in einzelnen Zellen größere violette Granula, die wahrscheinlich den im Zelleib befindlichen unfertigen Sporen entsprechen dürften (Fig. 13).

2) Behandelt man die Ausstriche mit 5proz. Tannin (5 Min.) und färbt dann nach Gram, so werden sie bei der Differenzierung in Alkohol völlig farblos. Mikroskopisch zeigt nur der Nucleolus eine violette Farbe, während der Zelleib farblos ist. Auch das Ektoplasma ist nicht mehr nachweisbar, im Gegensatz zu den normalen Hefezellen, bei denen man nach dieser Methode eine violette Zellmembran enthält (vgl. Mitteilung 2, Fig. 5).

3) Färbt man einen solchen Ausstrich mit Karbolfuchsin (5 Min.) und behandelt mit Ferrocyankali nach, so erscheinen die Zellen hellrot gefärbt, ohne Andeutung eines Ektoplasmas (Fig. 14).

4) Färbt man einen solchen Ausstrich mit Viktoriablau $^1/_4$ Min., so erscheint der Zelleib hellblau, ohne Spur einer äußeren Membran. Zuweilen tritt der Nucleolus als kleines dunkelblaues Granulum deutlich hervor (Fig. 15).

Wie diese Versuche lehren, läßt sich nach den Methoden 2—4, mit denen man an der grampositiven Hefe das Ektoplasma nachweisen kann, an der künstlich gramnegativ gemachten Hefezelle die äußere Membran mit basischem Farbstoff nicht mehr färben. Wohl aber ist eine Färbung des Ektoplasma mittels Tanninbeizung noch möglich.

Ein gramnegativer Hefeausstrich wird nach Gram gefärbt, mit Alkohol differenziert, mit Wasser abgespült, 2 Min. mit 5proz. Tannin nachbehandelt, abgespült und $^1/_4$ Min. mit Safranin nachgefärbt. Im hellen Zelleib ist der Nucleolus violett gefärbt und die Zellmembran rosarot (Fig. 16).

Färbt man einen solchen gramnegativen Hefeausstrich mit basischen Farbstoffen, z. B. Safranin, Fuchsin, Methylviolett, polychromes Meethylenblau usw., so erscheint der Zelleib — nicht aber das Ektoplasma — noch gefärbt. Dieser Versuch zeigt, daß im Zelleib jetzt noch ein saurer Körper enthalten sein muß.

Ein gramnegativer Hefeausstrich wird mit Fuchsin 2—3 Min. gefärbt und nach Abspülung getrocknet: Der Zelleib ist rot gefärbt, oft tritt der intensiv gefärbte Nucleolus als kleines Granulum hervor, dagegen ist das Ektoplasma nicht nachweisbar (Fig. 17).

Wenn man einen solchen mit Fuchsin gefärbten Hefeausstrich mehrere Minuten mit Aqua dest. differenziert, behalten die Zellen ihre Farbe bei.

Dieser saure Körper des Zelleibes, der an der gramnegativen Hefezelle mit basischen Farbstoffen noch nachweisbar ist, ist ebenfalls ein Lipoid, da er sich durch Behandlung mit 10proz. Salzsäure-Alkohol entfernen läßt.

Ein gramnegativer Hefeausstrich wird in eine Kuvette mit 10proz. Salzsäure-Alkohol (Ac. mur. conc. 10, Alkoh. abs. 90) für die Dauer von 24 Std. gestellt, nach der Herausnahme mit Wasser abgespült, 3 Min. mit Fuchsin gefärbt und nochmal mit Aqua dest. abgespült. Der Zelleib erscheint unter dem Mikroskop fast ungefärbt, nur der Nucleolus erscheint, oft von einem helleren Hof umgeben, in violetter Farbe (Fig. 18).

Die Violettfärbung des Nucleolus durch Fuchsin im letzten Versuch, die auf den ersten Blick völlig unerklärlich scheint, dürfte darauf beruhen, daß das Kernkörperchen mikrochemisch nachweisbares Eisen enthält, wie ich an anderer Stelle zeigen werde (vgl. Vortrag Mikrobiol. Ges. zu Berlin 19. 1. 1925 (10). Daß aber Fuchsin in wässeriger Lösung durch Eisenverbindungen (Eisenchlorid, Blutlaugensalze) violett gefärbt wird, habe ich bereits erwähnt. Wir müssen demnach in der Hefezelle und ebenso an den anderen grampositiven Bakterien mehrere saure Lipoide unterscheiden, und zwar 1) ein gramfestes Lipoid im Ektoplasma, das ich als Ekto(α)-Lipoid zu bezeichnen vorschlage, und 2) ein gramnegatives, mit basischen Farbstoffen nachweisbares Lipoid, das im Endoplasma enthalten ist, das also zweckmäßig als Endo(β)-Lipoid zu bezeichnen ist.

Schließlich enthält noch 3) der Nucleolus ebenfalls ein saures Lipoid, und zwar ein grampositives, da es sich nach Gram und mit anderen basischen Farbstoffen nachweisen läßt. Auch durch Nachbehandlung der gramnegativen Hefeausstriche mit 10proz. Salzsäure-Alkohol wird der Nucleolus nicht zerstört, wie der folgende Versuch beweist.

Ein gramnegativer, mit 10proz. Salzsäure-Alkohol 24 Std. nachbehandelter Hefeausstrich wird nach Gram gefärbt, in Alkohol differenziert und kurz mit Eosin nachgefärbt: Nucleolus ist violett, der Leib rosa gefärbt (Fig. 19).

Zum Unterschied von den beiden vorher genannten Ekto- und Endolipoiden kann das Lipoid des Nucleolus als δ-Lipoid des Kernkörperchens (Nucleolo (δ)-Lipoid) bezeichnet werden. Wir werden später zeigen, daß man in der Hefezelle einen exzentrisch gelegenen Kern mit basischen Farbstoffen nachweisen kann, ebenso wie an sämtlichen Bakterien, der ebenfalls ein gebundenes Lipoid enthält, und zwar wahrscheinlich ein grampositives, da es bei der gramnegativen Hefe nicht mehr nachweisbar ist. Für dieses Kernlipoid ist die Bezeichnung Nucleo(γ)-Lipoid reserviert. In diesen gramnegativen und mit Salzsäure-Alkohol nachbehandelten Hefezellen ist also, abgesehen vom Nucleolus, keine saure Substanz mehr enthalten und deshalb auch mit keinem basischen Farbstoff eine Färbung der Zelle mehr zu erzielen. Dagegen lassen sich diese lipoidfreien Hefezellen mit Leichtigkeit mit jedem sauren Farbstoff, und zwar sehr intensiv färben (Eosin, Erythrosin, Wasserblau, Guineagrün, Kongorot, Säureviolett 6 B usw.). Nichts ist geeigneter, die chemische Natur der Zell- und Bakterienfärbung zu erhärten, wie diese Tatsache. Während man einen nicht vorbehandelten Hefe- und Bakterienausstrich bekanntlich mit der wässerigen Lösung eines sauren Farbstoff im allgemeinen nicht färben kann (nur durch Säurezusatz ist eine schwache Färbung zu erzielen), gelingt es hier, die lipoidfreie Hefezelle auch mit Farbstoffen wie Wasserblau und Kongorot zu färben, die sonst überhaupt nicht oder mit Säurezusatz nur schwach färben. Diese auffällige Tatsache vermag die physikalische Färbetheorie keineswegs zu erklären. Wenn nämlich die histologische Färbung ein physikalischer Prozeß wäre, so ist nicht einzusehen, warum die nach den oben erwähnten Methoden vorbehandelten Hefezellen sich mit keinem basischen Farbstoff färben lassen, dagegen aber äußerst leicht jeden sauren Farbstoff aufnehmen. (Die Färbung erfolgt schon in wenigen Sekunden!) Dagegen vermag die chemische Theorie der Zellfärbung diese auffällige Tatsache sehr wohl zu erklären: Nach Entfernung aller sauren Bestandteile des Ekto- und Endoplasmas der Hefezellen bleibt die basische Grundsubstanz (eine sehr widerstandsfähige, nur in konzentrierten Laugen lösliche Eiweißverbindung zurück), die chemisch entgegengesetzte, nämlich saure Farbstoffe, sehr leicht aufnimmt. Eine solche basische Grundsubstanz mit starker Avidität für saure Farbstoffe hat bekanntlich Unna auch in den tierischen Zellen nachgewiesen.

An dieser lipoidfreien Hefezelle läßt sich jetzt auch die basische Grundsubstanz des Ektoplasmas durch Färbung mit einem sauren Farbstoff noch nachweisen, und zwar gelingt es, Endo- und Ektoplasma durch 2 verschiedene saure Farben darzustellen.

Pikrinsäure-Kongorot-Methode.

Ein lipoidfreier Hefeausstrich (erhalten durch Nachbehandeln eines gramnegativen mit 10proz. Salzsäure-Alkohol) wird 5 Min. mit einer gesättigten Pikrinsäurelösung, gefärbt, abgespült und ganz kurz (5—15 Sek.) mit Kongorot nachgefärbt, abgespült und getrocknet: Der Zelleib ist gelb gefärbt, das Ektoplasma tritt als scharf begrenzte braunrote Membran hervor. Außerdem sind in einzelnen Zellen 1—2—3 braunrot gefärbte, exzentrisch im Zelleib gelegene Ringe mit gelbem Zentrum, auf deren Bedeutung ich noch zurückkommen werde (Fig. 20).

Wie an der gramnegativen läßt sich auch an der lipoidfreien Hefezelle das Ektoplasma nach Tanninbeizung mit irgendeinem basischen Farbstoff färben. Deshalb gelingt es mit Leichtigkeit, Endo- und Ektoplasma in zwei verschiedenen Kontrastfarben darzustellen, und zwar dadurch, daß man das Endoplasma mit einem sauren Farbstoff vorfärbt und nach Beizung mit Tannin das Ektoplasma mit einem basischen Farbstoff in einer Kontrastfarbe darstellt.

Eosin-Tannin-Methylviolett-Methode.

Ein lipoidfreier Hefeausstrich wird mit Eosin kurz gefärbt (5—10—15 Sek.), abgespült, mit 30proz. Tannin 5 Min. lang behandelt, abgespült und mit Methylviolett 1—2 Min. nachgefärbt: Der Zelleib ist rosa gefärbt, das Ektoplasma erscheint als violetter Ring. Außerdem sind im Zelleib in zahlreichen Zellen 2—3 exzentrisch gelegene, kleine violette Ringe sichtbar (Fig. 21).

Guineagrün-Tannin-Fuchsin-Methode.

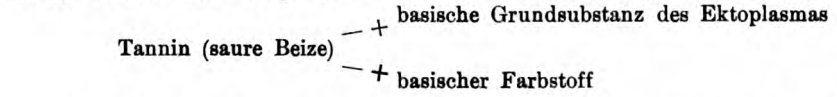
Ein lipoidfreier Hefeausstrich wird ganz kurz (5 Sek.) mit Guineagrün gefärbt, abgespült, mit 30proz. Tannin 5 Min. gebeizt, abgespült und 1—2 Min. mit Fuchsin nachgefärbt: hellgrüner Leib mit einzelnen kleinen roten Ringen und schwachrotem Ektoplasma. Der Nucleolus tritt bei dieser Methode als dunkelgrünes Granulum deutlich hervor (basische Grundsubstanz des Nucleolus!) (Fig. 22).

Die bei den zuletzt genannten Methoden auftretenden Ringe im Zelleib entsprechen den Membranen der in Bildung begriffenen im Zelleib befindlichen Sporen, wie ich an anderer Stelle beweisen werde.

IV. Theorie der Beizenfärbung.

Der interessanten Tatsache, daß man an der lipoidfreien Hefezelle, die also keinen sauren Körper mehr enthält und daher mit keinem basischen Farbstoff mehr sich färben läßt, das Ektoplasma nach Tanninbeizung sich mit jedem basischen Farbstoff färbt, kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie uns gestattet, den Mechanismus der für den färberischen Nachweis des Bakterienektoplasmas sehr wichtigen Tanninmethode zu erkennen. In der 1. Mitteilung über die Darstellung der grampositiven Bakterien wurde bereits der Vermutung Ausdruck gegeben, daß die Tanninmethode auf eine Tripelverbindung Ektoplasma—Tannin—basischer Farbstoff beruhen könnte. Durch den völligen Abbau der Hefezellen bis auf die letzte basische Grundsubstanz des Leibes und des Ektoplasmas läßt sich die frühere Annahme der Tripelverbindung eindeutig beweisen und dahin präzisieren, daß die Bindung des Tannins an die basische Grundsubstanz des Ektoplasmas stattfinden muß. Wenn man nämlich bedenkt, daß an der lipoidfreien Hefezelle das Ektoplasma nur noch die basische Grundsubstanz enthält und deshalb jeden sauren Farbstoff, aber keinen einzigen basischen mehr aufnimmt, andererseits aber berücksichtigt, daß nach Beizung mit dem chemisch sauren Tannin (Ac. tannicum

der Pharmakopoe!) befähigt ist, jeden basischen Farbstoff aufzunehmen, so kann die Wirkung des Tannins nur darauf beruhen, daß es als saure Beize einerseits mit der basischen Grundsubstanz des Ektoplasmas, andererseits mit dem basischen Farbstoff eine chemische Verbindung eingeht. Wenn man mit — + die chemische Bindung andeuten will, erhält man folgendes Schema für diese Tripelverbindung:



Die Wirkung des Tannins bei dieser Färbungsmethode läßt sich am besten veranschaulichen, wenn man sich eines in der Immunitätswissenschaft sehr gebräuchlichen Ausdruckes bedient, nämlich des Ambozeptors. In der Tat entfaltet das Tannin bei dieser Färbung einen ambozeptorartigen Charakter, indem es zwischen 2 Substanzen (basische Grundsubstanz des Ektoplasmas und einem basischen Farbstoff), die nicht die geringste Verwandtschaft zueinander aufweisen, eine chemische Haftung und Bindung herstellt. Von Interesse für die Theorie der Beizenfärbungen überhaupt dürfte auch die Tatsache sein, daß Tannin nicht die einzige ambozeptorartige saure Beize ist, daß man vielmehr an der lipoidfreien Zelle die basische Grundsubstanz des Ektoplasmas auch mit anderen sauren Körpern, wie z. B. Phosphormolybdänsäure, und Nachfärbung mit einem basischen Farbstoff erhalten kann.

Nach Aufklärung ihres Mechanismus ist die Methode der Beizung mit Tannin und Nachfärbung mit einem basischen Farbstoff ein Verfahren, das zu diagnostischen Zwecken in der Histochemie verwendet werden kann. Wenn es nämlich gelingt, irgendeinen Gewebsbestandteil mittels dieser Färbemethode darzustellen, so kann daraus der Schluß gefolgert werden, daß dieser Gewebsbestandteil eine basische Substanz enthalten müsse. Zum Beispiel gelingt es mit dieser Methode, an dem tierischen Gewebe die Membranen des Kernes, des Nucleolus und der Zelle isoliert darzustellen. (Vgl. Vortrag Mikrobiol. Gesellsch. zu Berlin 19. 1. 1925.)

Während also Unna (11) für die Zwecke der Mikrochemie Beizenfärbungen nur in der Form der Nachbeizen (z. B. Nachbeizung mit Tannin oder Jod usw. nach Färbung mit basischen Farbstoffen) verwendbar fand, können wir heute nach Aufklärung der Theorie der Beizenfärbungen auch Methoden mit vorangegangener Beizung und nachfolgender Färbung in der Chromolyse sehr wohl und mit Erfolg verwenden.

Nachdem diese Untersuchungen gezeigt haben, daß die basische Grundsubstanz des Ektoplasmas — oder allgemein gesprochen ein basisches Substrat — mittels einer wie ein Ambozeptor wirkenden sauren Beize mit basischen Farbstoffen sich färben läßt, drängte sich von selbst die Frage auf, ob auch der umgekehrte Weg möglich ist. d. h. ob sich ein saures Substrat — hier das saure Lipoid des Ektoplasmas — mittels einer basischen Beize mit einem sauren Farbstoff färben lasse. Die in dieser Richtung angestellten Untersuchungen haben ergeben, daß diese Frage mit Ja zu beantworten ist. Es gelingt in der Tat, das Ektoplasma der Hefezelle nach Beizung mit dem basischen Eisenchlorid (Liq. ferri sesquichlorati), z. B. mit dem sauren Farbstoff Säureviolett 6B (Kahlbaum) isoliert zu färben. Die Fär-

bung gelingt zwar auch an der unvorbehandelten Bakterienzelle, doch fallen die Bilder an mit verdünnter Salzsäure vorbehandelten Bakterien schöner aus.

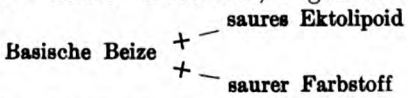
Eisenchlorid-Säureviolett-Methode.

Hitzefixierte Hefeausstriche werden 24 Std. mit verdünnter Salzsäure (10—25proz.) behandelt, gründlich mit Wasser abgespült und mit Eisenchlorid (Liq. ferri sesquichlorati der Pharmakopöe) 5—10 Min. gebeizt und ca. $^1/_4$—$^1/_2$ Min. mit Säureviolett nachgefärbt: Der schwach gefärbte Leib ist von einer intensiv violett gefärbten Membran umgeben, die in eine helle Außenschicht übergeht (Fig. 23).

Statt Säureviolett kann bei dieser Methode auch mit Kongorot nachgefärbt werden, wobei die Innenmembran in braunroter Farbe erscheint. Daneben sieht man in einzelnen Zellen schwärzliche Ringe, die der Membran der Innensporen angehören dürften und wahrscheinlich durch aufgenommenes metallisches Eisen schwarz erscheinen (Fig. 24).

Da die Färbung mittels einer basischen Beize erfolgt, so kann damit nur eine saure Substanz, also das saure Lipoid des Ektoplasmas gefärbt sein. Das wird dadurch bewiesen, daß an der lipoidfreien Hefezelle eine Ektoplasmafärbung mit dieser Methode nicht mehr zu erzielen ist: es färbt sich die gesamte Zelle (Endo- und Ektoplasma) intensiv violett, ganz gleich, ob man die Eisenchloridbeize vorausgeschickt hat oder nicht.

Dieser Färbung liegt also ebenfalls eine Tripelverbindung: saures Lipoid—Eisenchlorid—saurer Farbstoff, zugrunde.



Zu bemerken ist, daß in dem obigen Schema das Eisenchlorid durch eine Reihe anderer als basische Beizen wirkender Substanzen ersetzt werden kann, z. B. Alaun, Aluminiumchlorid, Kupfersalze usw., in denen die betreffenden Kationen ($Fe^{\cdot\cdot\cdot}$, $Al^{\cdot\cdot\cdot}$, $Cu^{\cdot\cdot}$), d. h. deren basischer Bestandteil als Ambozeptor wirkt. Im Gegensatz zu den sauren Beizen, bei denen mit jedem basischen Farbstoff eine Färbung zu erzielen ist, geben aber die basischen Beizen nur mit einzelnen, nicht aber mit allen sauren Farben ein gutes Bild.

Am tierischen Gewebe läßt sich mit Hilfe dieser Methode ebenfalls die Membran der Zelle, des Kernes und des Kernkörperchens zur Darstellung bringen, und zwar liefern Eisenchlorid-Säureviolett oder Alaun-Säureviolett sehr schöne und instruktive Bilder. (Vgl. Vortrag Patholog. Gesellsch. zu Berlin, Dez. 1924) (13).

Es würde zu weit führen, hier noch weiter auf die interessante Theorie der adjektiven Färbungen einzugehen. Bemerken möchte ich aber noch, daß man mit Hilfe der basischen Beizenfärbungen und anderer Methoden den Nachweis führen kann, daß gewisse Schwermetalle mit den sauren Lipoiden der Bakterienzelle (Ekto-Endo-Nukleolipoide) eine chemische Bindung eingehen, eine Tatsache, die für die Theorie der Desinfektionswirkung dieser Substanzen von großer theoretischer und praktischer Bedeutung sein dürfte.

V. Der Aufbau der Sporenmembran.

Bevor ich auf den Bau der Sporenmembran eingehe, möchte ich noch vorausschicken, daß der im Abschnitt III beschriebene Abbau

der Hefezelle und der Nachweis, daß deren Ektoplasma aus einer basischen Grundsubstanz und einem sauren gramfesten Lipoid besteht, mit gleicher Methodik, auch an anderen grampositiven Bakterien gelingt. So kann man z. B. durch 20 Min. langes Kochen mit 20proz. Salzsäure und nachfolgender Alkoholextraktion das B. anthracis zum allergrößten Teil gramnegativ machen. Nach dieser Vorbehandlung (Entfernung des Ektolipoids) gelingt die Färbung des Ektoplasmas mit Viktoriablau nicht mehr. Wohl aber ist die basische Grundsubstanz des Ektoplasmas mit sauren Farbstoffen und mittels Tanninbeize auch mit basischen noch nachweisbar. Auch beim B. anthrac. ist ein Endolipoid nachweisbar, und zwar durch Färbung so vorbehandelter Bakterien, z. B. mit Safranin. Durch Nachbehandlung mit 10proz. Salzsäure-Alkohol wird das Endolipoid entfernt, so daß eine Safraninfärbung des Leibes nicht mehr möglich ist. Wohl aber ist an dieser lipoidfreien Anthrax-Bakterienzelle nach Gram ein kleines Mikrogranulum darstellbar, das gewöhnlich an den Polen oder am Rande des Stäbchens gelegen ist.

Man kann demnach mit Recht behaupten, daß das Ektoplasma der grampositiven Bakterien den gleichen chemischen Bau, nämlich ein gramfestes Ekto- und Nukleololipoid und ein gramnegatives Endolipoid enthalten.

Was den Bau der Sporenhüllen betrifft, so muß man unterscheiden zwischen Bakterien, die, wie z. B. der Milzbranderreger, nur eine schmale Membran aufweisen, und anderen Mikroben, die, wie z. B. die Hefezelle, neben der eigentlichen Sporenmembran noch eine breite Kapsel besitzt, die mehrere Sporen gemeinsam umgibt. Bei der Erörterung des Baues der Sporenhüllen kann ich mich ganz kurz fassen. Sie zeigen im wesentlichen denselben Bau wie das Ektoplasma der zugehörigen Mikroben, d. h. sie bestehen aus einem grampositiven sauren Lipoid, das an die basische Grundsubstanz gebunden ist. Vom Ektoplasma unterscheiden sie sich nur dadurch, daß das Membranlipoid viel fester an das basische Eiweiß gebunden ist, so daß es durch kurzes Kochen mit verdünnter Salzsäure nicht abgespalten und daher bei der nachfolgenden Alkoholextraktion nicht gelöst werden kann. Erst eine mehrtägige Nachbehandlung mit Salzsäure-Alkohol bringt dieses Membranlipoid völlig zum Verschwinden.

Der Nachweis eines basischen und sauren Körpers in den Sporenhüllen gelingt nun deswegen so leicht, weil bei der Färbung mit wässerigen Farbstofflösungen bei gewöhnlicher Temperatur der Sporeninhalt ungefärbt bleibt, so daß mit Leichtigkeit die isolierte Färbung der Sporenhüllen gelingt.

Nachweis der basischen Grundsubstanz.

Ebenso wie beim Ektoplasma färbt sich auch die Sporenmembran mit Guineagrün. Eine Doppelfärbung erhält man mit Pikrinsäure-Guineagrün, wobei die Pikrinsäurelösung zur Färbung des Sporenkörpers erhitzt werden muß.

Ein hitzefixierter Ausstrich (Hefe, B. anthr.) wird mit einer gesättigten Pikrinsäurelösung, der etwa $^1/_2$proz. Salzsäure oder Essigsäure zugesetzt worden ist, erhitzt, 5—10 Min. gefärbt, abgespült und 5 Min. mit Guineagrün nachgefärbt: Sporen gelb, Membran und Kapsel grün (vgl. Fig. 7).

Auch mit der Tanninmethode, mit der nach den Ausführungen des Abschnittes IV die basische Grundsubstanz dargestellt wird, kann man

ebenfalls die Sporenhüllen färben (vgl. I. Mitteilg., Fig. 4b, 5, und Fig. 1a dieser Arbeit).

Nachweis des sauren Lipoids.

Der saure Körper der Sporenhüllen läßt sich mit einer großen Zahl von basischen Farbstoffen nachweisen, z. B. Viktoriablau (vgl. Fig. 11, Sporenmembran des B. anthrac. blau gefärbt), polychr. Methylenblau, Karbolmethylenblau, Ziehlscher Lösung, Safranin u. a. m.

Ein fixierter Ausstrich (Hefe, Anthrax) wird 5 Min. mit Safranin gefärbt, abgespült und getrocknet: Die Sporenmembran der Hefe und des Anthrax sind rot gefärbt, oft mit einem kleinen, roten Mikrogranulum am Rande (Fig. 25 u. 28).

Eine Doppelfärbung erhält man, wenn man z. B. mit Karbol-Methylenblau heiß vorfärbt (5 Min.), mit Essigsäure (5proz.) ca. 1—2 Min. differenziert, bis der Ausstrich hellblau erscheint, abspült und dann 5 Min. mit Safranin nachfärbt: Sporen blau, Kapsel rot (Fig. 26).

Färbt man einen Hefe- oder Milzbrandausstrich nach Gram und differenziert in Alkohol, so erscheinen die Milzbrandsporen als blauschwarze kleine Ringe mit hellem Zentrum. Die Hefesporen zeigen hierbei eine hellere Kapsel und dunkelblaue, schwarze Sporen (Fig. 27).

Die Gramsche Färbung beweist insbesondere, daß die Sporenhüllen (Membran und Kapsel) ein gramfestes Lipoid enthalten.

VI. Zur Chemie des Ektolipoids.

Wie in den vorausgegangenen Abschnitten auseinandergesetzt wurde, enthält das Ektoplasma der grampositiven Bakterien ein saures gramfestes Lipoid. Es wurde nun versucht, diesen sauren Körper näher zu charakterisieren. Die nachstehenden Untersuchungen und Ueberlegungen führten zum Ziele. Wenn man die große Reihe der bisher untersuchten Lipoide in Betracht zieht, so kann man drei Gruppen unterscheiden, nämlich das Cholesterin, Cholesterinester und die sogen. Phosphatide, d. h. Phosphor und Stickstoff enthaltende in Alkohol, Chloroform, Benzol usw. lösliche Stoffe. Die beiden erstgenannten Substanzen können im Ektolipoid nicht enthalten sein; denn das Cholesterin $C_{26}H_{47}O$ ist ein sekundärer Alkohol. Es enthält keine sauren Gruppen und nimmt, in Aether gelöst und in dünner Schicht auf Objektträger ausgestrichen, weder saure noch basische Farbstoffe an. Auch mit Sudan ist eine Färbung kaum zu erzielen. Ebensowenig kommt das zweite oben angeführte Lipoid in Frage. Denn dieses ist ein Fettsäure (Palmitin-Stearin-Olein-Säure)-Ester des Cholesterins. Die Cholesterinester sind nun sehr widerstandsfähige (nur durch alkoholische Kalilauge werden sie zersetzt, in Fettsäure und Cholesterin gespalten) und chemisch sehr wenig reaktionsfähige Körper, die weder basische noch saure Farbstoffe annehmen. Nur mit Sudan ist eine Färbung zu erzielen, wobei die Färbung keine chemische Bindung darstellt, vielmehr, wie alle Fettfärbungen, auf einem physikalischen Lösungsvorgang des Farbstoffes in einem Lipoid beruht. Das Ektolipoid der grampositiven Bakterien muß also, das lehrt eine einfache Ueberlegung, ein Phosphatid sein. Betrachten wir nun das einfachste bekannte Phosphatid, das Lezithin, so besteht es aus Glyzerin, Fettsäuren, Phosphorsäure und der Base Cholin von folgender Konstitutionsformel:

$CH_2 \cdot O \cdot$ Fettsäurerest
|
$CH \cdot O \cdot$ Fettsäurerest
|
$CH_2 \cdot O \cdot PO_2 \cdot$ Cholinrest.

Ein Blick auf die obige Formel lehrt, daß das Lezithin, das nur eine Base und drei saure Körper enthält, eine stark saure Substanz sein muß. Wenn nun unsere Annahme zutreffen sollte, daß Lezithin im Ektoplasma enthalten ist, so müßte es gramfest sein. Das ist in der Tat der Fall, wie folgende Versuche zeigen:

Die wässerige Emulsion eines Gehirnlezithins wird auf einen Objektträger ausgestrichen, getrocknet, nach Gram gefärbt, in Alkohol differenziert und mit verdünnter Ziehlscher Lösung nachgefärbt. Makroskopisch sieht der Ausstrich blau-violett aus, mikroskopisch sieht man dunkelblau violette Massen. Keine Rotfärbung.

Reines Lezithin ex ovo wird auf einen Objektträger ausgestrichen, nach Gram gefärbt und in üblicher Weise in Alkohol differenziert: ein Teil des Ausstriches löst sich dabei im Alkohol, der zurückbleibende Rest aber ist dunkelblau-violett gefärbt.

Auch mit anderen basischen Farbstoffen, insbesondere Viktoriablau, färben sich Lezithinausstriche sehr gut. Nach Beizung mit Eisenchlorid färben sie sich mit Säureviolett, geben also dieselben färberischen Reaktionen wie das Ektolipoid (vgl. Fig. 10 u. 23).

Diese Beobachtungen schienen dafür zu sprechen, daß Lezithin tatsächlich im Ektoplasma der Hefezellen enthalten ist. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde deshalb versucht, im alkoholischen Hefeextrakt, der ja das Ektolipoid enthält, Lezithin makrochemisch nachzuweisen.

Der alkoholische Hefeextrakt des Versuches im Abschnitt III (S. 10) wird zum Verdunsten gebracht. Es bleibt eine schmierige gelblich-bräunliche Masse zurück, die wie reines Lezithin aussieht. Ein erbsengroßes Stück wird in ätherfreiem Alkohol in einem Reagenzglas gelöst, mit 2 ccm einer 2proz. Ammoniummolybdatlösung versetzt und mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet: An der Berührungsstelle entsteht ein rötlicher Ring, der über Gelbgrün in Blau übergeht. Nach Carlo Casanova (12) ist diese Reaktion charakteristisch für Lezithin. In der Tat gibt reines Lezithin ex ovo diesellben Farbenreaktionen.

Da Farbenreaktionen für Lipoide allgemein nicht als absolute Identitätsbeweise angesehen werden, so mußte das Vorhandensein eines Phosphatids im Hefeextrakt durch den qualitativen Nachweis des Phosphors erhärtet werden.

Ein erbsengroßes Stück des Hefelipoids wird im Platintigel trocken verascht, der Rückstand mit n-Salzsäure aufgenommen, filtriert und mit einer filtrierten Lösung von Molybdänsäure-Strychnin versetzt. Es entsteht eine dichte Trübung, die sich langsam zu einem starken Niederschlag ausbildet. (Nephlometrischer Phosphornachweis nach Kleinmann) (14).

Hiermit glaube ich bewiesen zu haben, daß das Ektolipoid der Hefe ein Phosphatid, wahrscheinlich Lezithin, ist.

Ergebnisse.

Das Ektoplasma der Hefe und zum Teil auch anderer grampos. Bakterien besteht aus einer dicken, scharf begrenzten Innenmembran und einer zarten Außenmembran. — 2) Das Ektoplasma der grampos. Bakterien enthält eine basische Grundsubstanz, nachweisbar durch Guineagrün und mittels der Tanninmethode, und einen sauren Körper, nachweisbar durch Viktoriablau (nach Entfernung der Nukleoproteide).

— 3) Der saure Körper des Ektoplasmas, auf dem die Gramsche Färbung beruht, ist ein Lipoid. — 4) Die Beizenfärbungen beruhen auf einer Tripelverbindung. Mittels saurer Beize (Tannin, Phosphormolybdänsäure) wird ein basischer Gewebsbestandteil mit basischen Farbstoffen gefärbt. Bei den basischen Beizen (Eisenchlorid usw.) wird ein saurer Bestandteil mit einem sauren Farbstoff gefärbt. — 5) Die Sporenhüllen der grampos. Bakterien bestehen ebenfalls aus einer basischen Grundsubstanz, die chemisch an ein saures gramfestes Lipoid gebunden ist. — 6) Das Ektolipoid der Hefe ist ein Phosphatid, wahrscheinlich Lezithin. — 7) Außerdem enthalten die grampositiven Bakterien im Zelleib ein gramnegatives, ebenfalls saures Lipoid, nachweisbar durch basische Farbstoffe an den künstlich gramnegativ gemachten Bakterien.

Erläuterung der Abbildungen.

Die Fig. 1—28 sind mit 2 mm Oelimmersion, Okkular 4 (Zeiß) gezeichnet worden.

Fig. 1. Hefezellen. Safranin-Tannin (5proz.) Methylenblau-Methode. Zelleib rot, schmales blaues Ektoplasma.

Fig. 1a. Milzbrand. Polychromes Methylenblau-Tannin (5proz.) Safranin-Methode. Zelleib schwach bläulich, dunkle Granula meist an den Polen. Die Teilungslinien und das schmale Ektoplasma ist rot gefärbt. Die freien Sporen und Innensporen (oberes rechtes Stäbchen) zeigen ein helles Zentrum und eine rote Membran, oft mit einem kleinen dunklen Mikrogranulum am Rande.

Fig. 2. Hefeausstrich. Karbolmethylenblau-Tannin(30proz.)-Safranin-Methode. Zelleib bläulich, oft mit kleinem, dunklem Nukleolus, breitem, rotem Ektoplasma.

Fig. 2a. Milzbrand. Karbolmethylenblau-Tannin(30proz.)-Safranin-Methode. Bläulicher Leib, mit vereinzelten dunklen Granula, breitem, rotem Ektoplasma.

Fig. 3. Hefe. Karbolphosphin-Tannin-Guineagrün: Leib gelb, Innenmembran dunkelgrün, Außenmembran hellgrün.

Fig. 4. Hefeausstrich. Tannin-Guineagrün-Methode: Leib schwach gefärbt, Innenmembran dunkel-, Außenmembran hellgrün.

Fig. 5. Hefe. Ferrozyankalium-Viktoriablau-Tannin-Safranin-Methode: Leib schwach gefärbt, Innenmembran blau-violett, Außenmembran rosarot gefärbt.

Fig. 6. Hefe. Pikrinsäure-Guineagrün-Methode: Leib gelb, Ektoplasma grün.

Fig. 7 u. 8. Milzbrand und Staphylokokkus. Phosphin-Guineagrün-Methode: Leib gelb, Teilungslinien und Ektoplasma grün. Die Milzbrandspore ist gelb gefärbt mit grüner Membran.

Fig. 9. Hefe. Karbolfuchsin-Ferrozyankalium-Methode: Leib rot, Ektoplasma violett.

Fig. 10. Hefe. Viktoriablau-Methode: Leib schwach bläulich, Ektoplasma dunkelblau.

Fig. 11 u. 12. Milzbrand und Pneumokokkus. Viktoriablau-Methode: Leib schwach bläulich bzw. ungefärbt, Teilungslinie des Ektoplasma blau. Milzbrandspore zeigt helles Zentrum, blaue Membran und ein kleines Mikrogranulum am Rande.

Fig. 13. Hefe, künstlich gramnegativ gemacht, Färbung: Gram-Eosin. Zelleib rosa gefärbt, meist mit dem violetten Nucleolus von hellem Hof umgeben. Außerdem in einzelnen Zellen größere violette Granula, die den Innensporen angehören.

Fig. 14. Hefe, gramnegativ gemacht. Karbolfuchsin-Ferrozyankalium-Methode: Leib rot, vereinzelt dunkler Nucleolus. kein Ektoplasma.

Fig. 15. Hefe, künstlich gramnegativ gemacht. Färbung wie Fig. 10: Leib blau gefärbt, zuweilen Nucleolus sichtbar, kein Ektoplasma.

Fig. 16. Gramnegative Hefe. Färbung Gram-Tannin-Safranin: Nucleolus violett, Ektoplasma rot.

Fig. 17. Gramnegative Hefe. Fuchsinfärbung. Kein Ektoplasma, Leib rot, Nucleolus rötlich violett.

Fig. 18. Lipoidfreie Hefe. Fuchsinfärbung: Leib nur schattenhaft gefärbt, Nucleolus violett.

Fig. 19. Lipoidfreie Hefe. Färbung Gram-Eosin: Nucleolus violett, Leib rosa gefärbt.
Fig. 20. Lipoidfreie Hefe. Pikrinsäure-Kongorot-Methode: Leib gelb, oft mit kleinen, braunroten Ringen (Membran der Innensporen), Ektoplasma braunrot.
Fig. 21. Lipoidfreie Hefe. Eosin-Tannin-Methylviolett-Methode: Leib rötlich, mit kleinen violetten Ringen, Ektoplasma violett.
Fig. 22. Lipoidfreie Hefe: Guineagrün-Tannin-Fuchsin: Ektoplasma rot, Leib schwach grün, Nucleolus dunkelgrün, vereinzelte rote Ringe.
Fig. 23. Mit verdünnter Salzsäure vorbehandelte Hefe. Eisenchlorid-Säureviolett-Methode. Innenmembran dunkelviolett, Außenmembran hellviolett.
Fig. 24. Gleiche Vorbehandlung. Eisenchlorid-Kongorot-Methode. Ektoplasma braunrot, Zelleib gelblich mit schwärzlichen Ringen. (Schwärzung durch aufgenommenes Eisen).
Fig. 25. Normale Hefe. Safraninfärbung. Zellen dunkelrot gefärbt, Sporenmembran hellrot mit kleinem Mikrogranulum am Rande.
Fig. 26. Hefe. Karbolmethylenblau-Essigsäure-Safranin: Zellen rot, Sporen blau, Kapsel rötlich.
Fig. 27. Hefe. Gramsche Färbung: Zellen blau-schwarz, Sporen dunkelblau, Kapsel hellblau.
Fig. 28. Milzbrandsporen. Safraninfärbung: Sporenmembran rötlich, oft mit winzigem rötlichen Mikrogranulum. Sporenkörper ungefärbt.

Literatur.

1) Gutstein, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. — 2) Eisenberg, Ph., Theorie der Bakterienfärbung. (Handb. d. mikrobiol. Technik von Kraus-Uhlenhuth, Bd. 1. S. 172.) — 3) Unna, Chromolyse. (Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. 6. T. 2. S. 57 ff.) — 4) Ibidem, S. 29. — 5) Michaelis, L., Der heutige Stand der allgemeinen Theorie der histologischen Färbung (Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 91. 1920. S. 580 ff.) — 6) Gutstein, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 94. H. 3/4. — 7) Toennissen, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 85. S. 225 ff. — 8) Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 93. S. 236. Vgl. auch 6.) — 9) Schumacher, Ibidem. S. 266. — 10) Gutstein, Ueber das Ektoplasma und den Kern der Bakterien. (Ibid. Ref. Bd. 78. S. 562.) — 11) Unna, Chromolyse. (l. c. S. 31.) — 12) Zit. nach S. Fränkel in Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. I. T. 6. II. 1. S. 77. — 13) Vgl. Klin. Woch. 1925. Nr. 12. — 14) Kleinmann, Biochem. Zeitschr. 1919.

Nachdruck verboten.

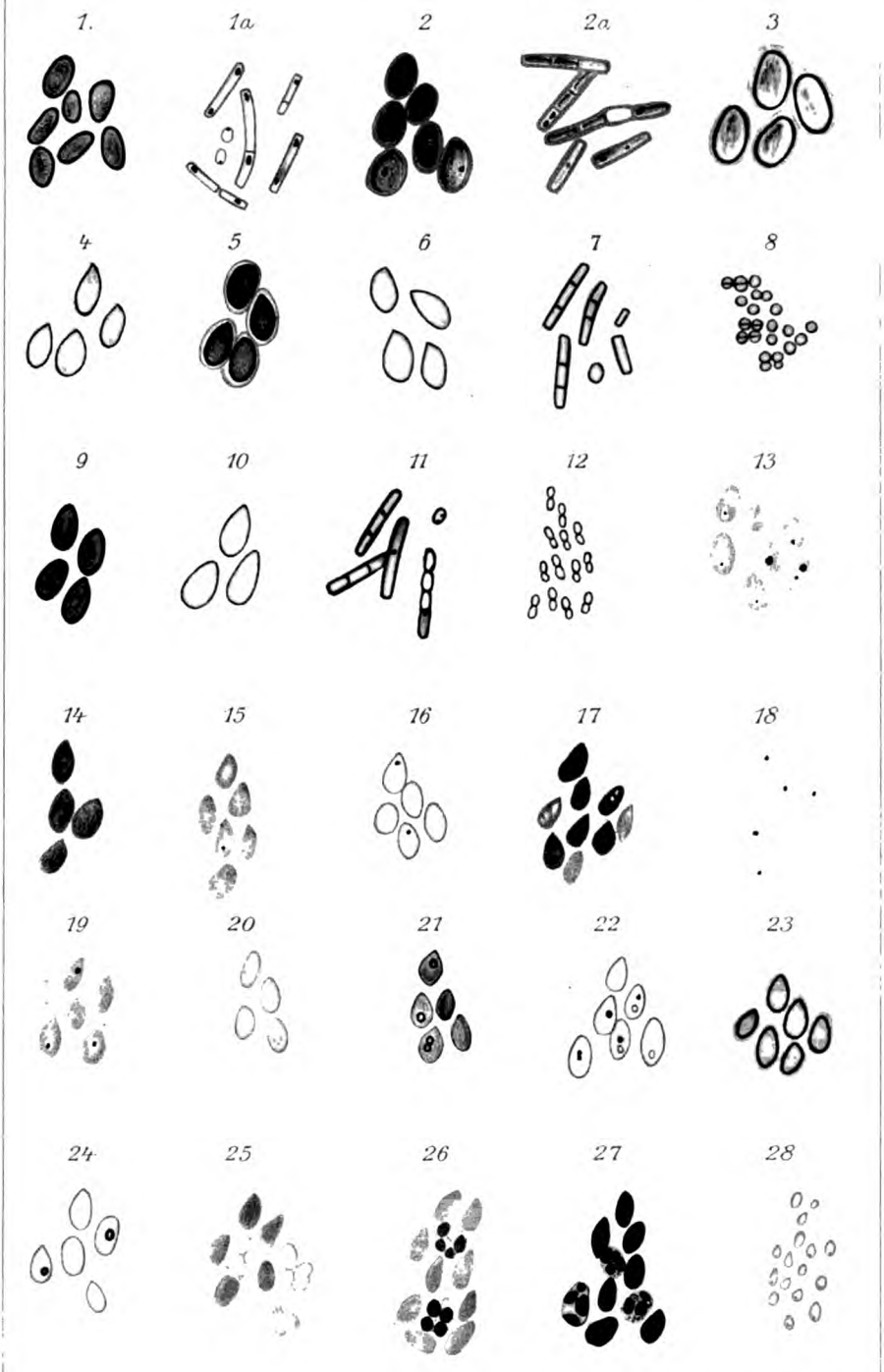
Ueber einen mit Formol bereiteten Typhusimpfstoff.

[Aus dem Epidemiologischen Institut in Nisch, Jugoslavien.]

Von Dr. **G. P. Alivisatos.**

Die subkutane Schutzimpfung gegen Typhus, Paratyphus und Cholera hat während des Weltkrieges eine strenge Probe gut überstanden. Manche Autoren bezweifeln zwar die günstigen Erfolge (Friedberger), doch sind diese Stimmen ohne Echo geblieben. Die Berichte Kuhns (1907), Museholds (nach Kolle Hetsch), Hünermanns (1916) und diejenigen anderer Autoren aus am Kriege beteiligten Staaten sowie die noch jetzt nach dem Kriege zu bemerkende Abnahme der Typhusmorbidität (Hage) beim männlichen Geschlecht gegenüber der Morbidität des weiblichen Geschlechts, schließlich die fast überall beobachtete Tatsache, daß von den unter gleichen hygienischen Verhältnissen und unter gleichen Wasserversorgungsmöglichkeiten stehende Militär- und Zivilbevölkerung die geimpfte Militärbevölkerung kaum, dagegen die ungeimpfte Zivilbevölkerung stark an Typhus gelitten hat, haben einen unumstößlichen Beweis für den Erfolg der Schutzimpfung gegen Typhus erbracht. Die von mir gemachten diesbezüglichen Beobachtungen, bei denen das geimpfte Militär im Gegensatz zum Zivil von Typhus fast verschont blieb, sind von besonderer Bedeutung, da sie in stark verseuchten Gegenden gemacht wurden, in denen fast keine hygienischen Maßnahmen für das Militär getroffen worden waren.

Somit ist die Schutzimpfung gegen Typhus und Paratyphus in Gegenden, in denen diese Krankheiten endemisch sind, und wo in absehbarer Zeit keine Assanie-



Verlag von Gustav Fischer in Jena. Lith. Anst. v. Johannes Arnoldt, Jena.

LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS

rung vorgenommen werden kann, nicht nur eine indizierte prophylaktische Maßnahme, sondern vielmehr eine hygienische Notwendigkeit, und der Hygieniker oder Epidemiologe, welcher diese Maßregeln bei solchen Verhältnissen unterläßt, begeht damit einen groben Fehler. Man kann ruhig behaupten, daß man durch die Einführung der Schutzimpfung gegen Typhus „per os" einen Schritt weiter gekommen ist, denn man kann ohne irgend welche Unannehmlichkeiten, ohne die geringste Temperaturerhöhung, ohne lokale Schmerzen und allgemeines Unwohlsein hervorzurufen, gegen Typhus und Paratyphus schützen. Durch eine Reihe von Experimenten, welche wir später veröffentlichen werden, sind wir zu denselben Resultaten wie Besredka gelangt, und die bei uns erzeugten Impfstoffe für den Gebrauch „per os" haben die Probe im endemischen Milieu mit vollem Erfolg bestanden; die zu impfenden Leute, größtenteils Bauern, haben diese Art der schmerzlosen Immunisierung im Gegensatz zur subkutanen Impfung meistens gern angenommen und voreilige Naturen hätten vielleicht deshalb behaupten können, daß der subkutanen Schutzimpfung die letzte Stunde geschlagen habe. Nun ist dem nicht ganz so. Es ist erstens ganz einseitig, die Frage nur vom Standpunkte der guten Aufnahme der Immunisierung „per os" beim Publikum zu betrachten, man muß vielmehr die Dauer des Schutzes in Betracht ziehen und auch die wirtschaftliche Seite nicht ganz außer Acht lassen. Was nun die Dauer des Schutzes bei der Immunisierung „per os" anbelangt, so wäre es noch verfrüht, darüber zu sprechen, doch könnten der Ausgang unserer Experimente und etliche Beobachtungen dafür sprechen, daß die „per os" mit den üblichen Dosen erlangte Immunität von nicht zu langer Dauer ist.

Aber außer der Umständlichkeit einer solchen Immunisierung, welche verhältnismäßig oft wiederholt werden müßte, — man denke nur an die Interesselosigkeit des gesunden Menschen für Schutzimpfungen — muß man auch immer ihre Kostspieligkeit in Betracht ziehen. Denn sowohl die öftere Vornahme der Immunisierung „per os", als auch eventuelle Erhöhung der Dosis bei nur einer einzigen Immunisierung führt zu einem Mehrverbrauch und wird damit unwirtschaftlich. In beiden Fällen muß man große Mengen Impfstoffes in Vorrat halten, d. h. erzeugen und nach einer aproximativen Berechnung kostet eine Immunisierung „per os" ungefähr 20—25mal mehr als eine subkutane Impfung mit dem kostspieligsten der subkutanen Impfstoffe. Die Immunisation „per os" wird daher voraussichtlich nur für die Zivilbevölkerung in Friedenszeiten in Betracht kommen, während die subkutane Schutzimpfung gegen Typhus besonders beim Militär, in Schulen usw. vorläufig und vielleicht auch späterhin die vorteilhaftere Impfungsart bleiben wird, gerade weil dieselbe viel leichter durchführbar, billiger und nachhaltiger ist.

Es sind nun aber alle Arten der Schutzimpfung in der Regel mit solchen Unannehmlichkeiten verbunden, daß dieselben nur obligatorisch durchgeführt werden konnten, denn wie bekannt begegneten sie ja in den breiten Volksmassen selbst in gänzlich mit Typhus verseuchten Gegenden auch bei vorausgegangener regster Propaganda größtem Widerstande. Die Ursachen sind wohl verständlich; es sind die allgemeine und die lokale Reaktion, welche die Geimpften so ernst nehmen, wozu noch die Umständlichkeit der wiederholten Einspritzung kommt, die gerade von dem Vorgeimpften sehr gefürchtet wird.

Ein Impfstoff, welcher im Publikum Anklang finden soll, darf daher 1. nur einer einmaligen Injektion benötigen, und 2. nur geringe allgemeine und lokale Reaktionen verursachen. Vom wissenschaftlichen Standpunkte aus muß aber ein solcher Impfstoff soviel Bakterienleiber in der einzigen Dosis und in einem solchen Zustand konserviert enthalten, wie es zur Erzielung einer sicheren und dauerhaften Immunisierung mit einer einzigen Impfung notwendig ist.

In dieser Richtung wurden bisher, besonders während des Krieges, Versuche gemacht — so hat z. B. Fornet schon 1912 die Verwendung eines eiweißarmen Impfstoffes empfohlen — das von ihm angegebene ziemlich komplizierte Verfahren der Kultivierung der Typhusbazillen in mit 0,5 Proz. Pepton versetzter Langendorfer Salzlösung mit nachträglichem Dialysieren konnte sich nicht einbürgern und, so weit aus der Literatur zu ersehen ist, wurde dieser Impfstoff in größerem Maßstabe bis jetzt nicht verwendet. Nach Hetsch, welcher mit dem Impfstoffe 6 Aerzte immunisierte, sind die lokalen Reaktionen nicht milder, als nach Einspritzung des Pfeiffer-Kolleschen Impfstoffes.

Bela Johan hat das Abwaschen des Impfstoffes empfohlen, um ihn weniger toxisch zu machen. E. Le Moignic und A. Sèzary haben einen Impfstoff hergestellt, welcher in 1 ccm eines Oelgemisches $5^1/_2$ mgr von Typhus, Paratyphus A- und B-Bazillen (im Verhältnis 2 : 1,75 : 1,75 mgr) enthält, geringe Reaktionen hervorruft und nur ein einziges Mal einverleibt zu werden braucht. Die Autoren heben hervor, daß die Ursache der geringen Toxizität des Präparates auf die Eigen-

tümlichkeit der Bakterienleiber zurückzuführen ist, daß sie sich in dem Oelgemische nicht einzeln befinden, sondern sich zu kleinen Bröckeln zusammenballen. Die daraus folgende langsamere Resorption ist nach Angabe der Autoren der Hauptgrund für die geringeren Reaktionen, welche die Injektion des Präparates hervorruft; der Erfolg der Immunisation wird dadurch gar nicht beeinflußt, da die immunisierende Wirkung dieses Impfstoffes der anderer Impfstoffe gleichwertig ist.

Ich möchte diese historische Uebersicht abschließen, einerseits weil die Zahl der vorgeschlagenen Verbesserungen der Typhus-, Paratyphusimpfstoffe fast unendlich ist, wobei sehr wenige von diesen verbesserten Impfstoffen in größerem Umfange ausprobiert worden sind, so daß die vermeintliche Verbesserung sich nur auf eine meistens theoretische Argumentation stützt, und andererseits, weil ich nicht imstande bin, mir auf Grund eigener Versuche ein persönliches Urteil über diese verbesserten Impfstoffe zu bilden. Meine Erfahrungen erstrecken sich nur auf den Pfeiffer-Kolleschen Impfstoff (2maliges Impfen mit je $^1/_8$ Oese) und auf das Lipovakzin nach Le Moignic-Sèzary, so daß ich nur über diese mit einer gewissen Sicherheit ein Urteil abgeben kann.

Ich habe während des Krieges als Chef eines Impfzentrums und eines Zentrallaboratoriums ungefähr 6000 Leute mit dem Impfstoffe Pfeiffer-Kolle und 14000 mit dem Lipovakzin nach Le Moignic-Sèzary geimpft und beobachtet. Die überwiegende Zahl der Geimpften waren eingerückte Reservisten, manche waren wiederholt, die Mehrzahl aber zum ersten Male geimpft worden. Die Reaktionen nach der Impfung konnten meistens von mir selbst oder von meinen Assistenten genau beobachtet werden, so daß ich in der Lage bin, im folgenden summarisch über das Resultat zu berichten.

Beide Impfstoffe haben die Probe im epidemischen oder endemischen Milieu gut überstanden, wobei ich nochmals erwähnen muß, daß außer der Impfung keine anderen besonderen hygienischen Maßnahmen zur Abwehr gegen Typhus getroffen wurden, so daß diese Probe sicherlich für streng genug gelten kann. Erst 9—16 Monate nach der Impfung konnte ich lediglich 7 sichere Typhusfälle bei diesen Geimpften feststellen; ich glaube bestimmt annehmen zu können, daß ich infolge meiner damaligen Stellung auch wirkich gut orientiert war. 3 von diesen Typhusfällen zeigten sich bei Soldaten, welche nach Pfeiffer-Kolle geimpft waren (einer von ihnen nur ein einziges Mal); 4 dagegen entfielen auf jene Gruppe, die mit Lipovakzin geimpft war. Aus diesen Zahlen irgendwelche vergleichende Schlüsse über den Wert der beiden Impfstoffe zu ziehen, ist sicherlich nicht angängig, um so mehr, als die Beobachtungszeit für den Impfstoff nach Pfeiffer-Kolle sich ungefähr auf 16 Monate erstreckte, jene für das Lipovakzin dagegen nur auf 11 Monate. Ich glaube aber keinen Fehler zu begehen, wenn ich den Wert der beiden Impfstoffe gleich setze und somit sofort die Frage aufwerfe, welche Vorzüge der eine vor dem anderen besitzt.

Das Lipovakzin wird ein einziges Mal eingespritzt, der Impfstoff nach Pfeiffer-Kolle zwei- oder dreimal. In dieser Hinsicht besitzt schon das Lipovakzin einen bedeutenden Vorzug, denn man soll um jeden Preis trachten, wenn man die Schutzimpfung als ein Vorbeugungsmittel gegen Typhus in weitesten Schichten der Bevölkerung verbreiten will, dieselbe nur einzeitig durchzuführen, da sonst diese Impfung, ausgenommen in den Kriegszeiten, praktisch fast unmöglich wird. Dagegen ist das Lipovakzin viel kostspieliger und seine Her-

stellungsweise viel komplizierter als jene des Pfeiffer-Kolleschen Impfstoffes. Was nun die Reaktionen anbelangt, konnte ich genaue Beobachtungen bei den Geimpften machen: die lokalen Reaktionen (Schwellung der geimpften Gegend, Rötung, Schmerz usw.) treten bei beiden Impfstoffen auf. Bei dem Pfeiffer-Kolleschen Impfstoffe sind Schwellung und Rötung deutlicher, weil der Impfstoff subkutan gegeben wird, bei Lipovakzin dagegen weniger bemerkbar, weil dasselbe intramuskulär unter die Schulter eingespritzt wird. Die anderen Symptome jedoch sind gleich stark (Druckempfindlichkeit, Gefühl der Schwere am Ort der Impfung, so daß manchmal die Bewegungen des Armes sehr erschwert werden usw.).

Was die allgemeinen Reaktionen anbelangt, so fehlen dieselben fast niemals. Sie treten bei der nach Pfeiffer-Kolleschen Geimpften gewöhnlich nach 2—5 Std. nach der Einspritzung, bei den mit Lipovakzin Geimpften etwas später, d. h. nach 4—8 Std. auf. Hier weichen unsere Beobachtungen von jenen der Autoren Le Moignic-Sèzary etwas ab. Nach ihren Angaben haben 66 Proz. der Geimpften 7—8 Std. nach der Einspritzung normale Temperatur, nur 27 Proz. zeigen eine fieberhafte Erhöhung bis zu 38,5°, 4 Proz. von 38,6—39°, und 1 Proz. über 39°.

Nach unseren Beobachtungen weisen dagegen 76 Proz. von den Geimpften eine erhöhte Temperatur zwischen 38—39,5° (meist über 39° auf), die übrigen haben nur eine geringe Temperaturerhöhung bis zu 38°. Am nächsten Tage zeigen nach Angaben der obigen Autoren 73 Proz. von den Geimpften keine Temperaturerhöhung, 23 Proz. einen Temperaturanstieg bis zu 38°, 1 Proz. zwischen 38,6—39,2°, 2 Proz. zwischen 39° und 39,5°. Nach 36 Std. haben 40 Proz. normale Temperatur, 45 Proz. nicht über 38,5°, 7 Proz. 38,6—39°, und 8 Proz. mehr als 39°. Nach unseren Beobachtungen dagegen zeigen nach 24 Std. 62 Proz. der Geimpften noch eine Temperatur 38° bis 38,5°, 6 Proz. mehr als 39°, $1^1/_2$ Proz. 40°, die übrigen zwischen 37 und 38°. Nach 36 Std. fanden die obigen Autoren noch bei 45 Proz. der Geimpften Temperaturen bis zu 38,5°, bei 7 Proz. von 38,6—39°, und bei 8 Proz. über 39°. Dagegen zeigen nach unseren Beobachtungen nur 27 Proz. der Geimpften Temperaturerhöhung bis 38,5°, 1 Proz. bis 40°, die übrigen zwischen 37—37,5°. Aus allem diesen geht hervor, daß nach meinen Beobachtungen der Temperaturanstieg bei den mit Lipovakzin Geimpften nicht viel später eintritt als bei den mit Impfstoff nach Pfeiffer-Kolle Geimpften, weiter daß die thermale Reaktion (obwohl sehr mild) in etwa 20 Proz. der Fälle etwas länger bei den mit Lipovakzin als bei den nach Pfeiffer-Kolle Geimpften dauert. Bei diesen letzteren haben wir übrigens etwa dieselben Temperaturkurven beobachtet, wie sie Hetsch und Kutscher in ihrer bekannten Arbeit geschildert haben.

Außer dem Temperaturanstieg rufen beide Impfstoffe nach der Impfung Erscheinungen toxischer Natur hervor. Es sind das Abgeschlagenheit, Kopfweh, Erbrechen, Arthralgien, Appetitlosigkeit und Schlaflosigkeit. Außer der Abgeschlagenheit, welche auch beim Lipovakzin sehr oft vorkommt und manchmal über 36—48 Std. dauert, sind alle anderen Erscheinungen viel seltener und verlaufen, wenn sie vorkommen, viel milder. Besonders selten ist das Erbrechen bei den mit Lipovakzin Geimpften (1:300), dagegen häufig (ca. 5 Proz.) bei

der anderen Gruppe. Schwere Erscheinungen nach den Impfungen verursachte keiner der beiden Impfstoffe.

Zusammenfassend können wir sagen, daß das kostspielige und in seiner Bereitungsart viel kompliziertere Lipovakzin ebenso gut wie der Impfstoff nach Pfeiffer-Kolle gegen Typhus schützt, daß aber nur ein einziges Mal geimpft zu werden braucht, und daß der Impfstoff außerdem weniger toxisch als der Pfeiffer-Kollesche Impfstoff zu sein scheint.

Was sind nun die Ursachen dieser Vorzüge? Nach den Angaben der Autoren sollte diese Eigenschaft des Lipovakzins auf die langsame Resorption des Impfstoffes, welcher zu Bröckeln zusammengeballt einem öligen Vehikel aufgeschwemmt ist, zurückzuführen sein. Nach meinen Beobachtungen kann ich dieser Auffassung nicht beistimmen, besonders wenn man annimmt, daß die thermische Reaktion eine Folge der Resorption des Impfstoffes ist, denn diese und alle anderen Reaktionen mit ihr treten meist nicht erst nach 24—48 Std., wie die Autoren zu konstatieren geglaubt haben, sondern größtenteils schon nach 4—8 Std., d. h. nur sehr wenig später als bei der Verwendung anderer Impfstoffe auf, was dafür spricht, daß die Resorption gar nicht so besonders langsam von statten geht. Meine Beobachtungen mit der Argumentation etwa zurückweisen zu wollen, daß es sich bei diesem sehr frühzeitigen Eintreten der Reaktionen und des Fieberanstieges um Malariaanfälle handelt, ist nicht gelungen, da man nicht ein einziges Mal in den zahlreichen, während des Fiebers untersuchten Fällen Plasmodien auffinden konnte. Uebrigens standen die Mannschaften außerdem größtenteils unter ständiger Chininisation.

Auch der Verlauf der anderen Symptome spielt sich in demselben Zeitraume ab wie bei den mit dem Pfeiffer-Kolleschen Impfstoff Geimpften. Aus alldem darf man meiner Meinung nach schließen, daß die geringere Toxizität des bazillenreicheren Lipovakzins nicht auf verlangsamte Resorption, sondern auf eine spezielle Wirkung des Oelgemisches und vielleicht des Eugenols (die Autoren geben geringe Mengen dieses Stoffes in die Paratyphus B-Emulsion) auf die Bakterienleiber zurückzuführen ist, durch welche die Antigene- und schutzerzeugende Komponente der Bakterien gar nicht oder nur wenig angegriffen wird, dagegen die Toxizität herabsinkt.

Daraus erwächst sofort die Frage: Gibt es vielleicht noch andere chemische Substanzen, die dasselbe leisten könnten (Herabsetzung der Toxizität), welche aber, nachdem sie diese Wirkung erfüllt haben, aus dem Impfstoffe entfernt werden können, und bei deren Verwendung sich die Herstellung des Impfstoffes vereinfachen würde. Schließlich müßte ein solcher Impfstoff gut immunisieren und, um seine Existenz neben den bisherigen Präparaten zu rechtfertigen, leichter injizierbar sein als diese. (Bekanntlich erfordert ja die Injektion von Lipovakzin einige Kanülen, deren Sterilisierung überdies in Rizinusöl vorgenommen werden muß.)

Nach Versuchen mit verschiedenen Substanzen habe ich mich zuletzt für das Formol entschlossen und glaube, daß der mit ihm bereitete Impfstoff die gewünschten Bedingungen voll erfüllt, d. h. daß der mit Formol erzeugte Impfstoff 1) leicht herstellbar ist, 2) lang aufbewahrt werden kann, 3) nach nur einer Einspritzung gut immunisiert, und 4) dabei so wenig toxisch ist, daß er in hohen Dosen injiziert werden kann. Der Gebrauch von Formol für die Herabsetzung der Toxizität

ist nicht neu. v. Eisler und Löwenstein haben durch Formol die Giftigkeit des Tetanustoxins so herabgesetzt, daß mit ihrem Formol-Toxingemisch rasch und mit Erfolg Pferde immunisiert und hohe Antitoxinwerte erlangt werden konnten. Dieselben Autoren bemerkten aber, daß das Formol keinen guten Einfluß auf das Diphtherietoxin ausübt und sind deshalb der Ansicht, daß es besser ist, unter Beibehaltung der älteren Methode Pferde mit einem Toxin-Antitoxingemische zu immunisieren[1]).

Auf Grund dieser rein empirisch gewonnenen Tatsachen habe ich einen mit Formol behandelten Typhusimpfstoff hergestellt, über welchen ich im folgenden kurz berichten will.

Bereitungsart: Die mit Agar (3 Proz. $pH = 7{,}8$) gefüllten Agarflaschen oder Kolle-Kolben werden mit den betreffenden Bakterien in einem bestimmten Verhältnis beimpft, und zwar so, daß auf je 20 Flaschen 11 mit Typhus, 5 mit Paratyphus B, je 2 mit Paratyphus A und Paratyphus C entfallen (die zu impfenden Bakterien wurden bei uns meistens im Lande isoliert und vorher biologisch und agglutinatorisch streng geprüft. Es wurden nur ganz typische Bakterienstämme verwendet, welche nach alter Tradition reichlich Agglutinine bildeten und von Immunseris ab bis zum Titer agglutiniert wurden). Nach 24stünd. Bebrütung werden die Agarflaschen mit 60 ccm, die Kolle-Kolben mit 10 ccm einer sterilen 0,8proz. Kochsalzlösung abgespült und die so gewonnenen Suspensionen jeder Bakterienart in eigenen Kolben gesammelt. Diesen Suspensionen wird unter ständigem Rühren käufliches Formol zugesetzt, und zwar für Typhus, Paratyphus A und Paratyphus C je 1 Proz., für Paratyphus B 1,5 Proz. Die Suspensionen werden gut durchgeschüttelt, hierauf für 6 Std. bei 37° in den Brutschrank gestellt[2]), und kommen schließlich für 30 Std. in den Eiskasten. Nach wiederholten Untersuchungen haben wir uns überzeugen können, daß die Bakteriensuspensionen unter Einwirkung des Formols schon nach einigen Minuten steril werden, die Herabsetzung der Toxizität aber wird nur durch langdauernde Einwirkung des Formols erzielt, wodurch die oben angegebenen, empirisch gefundenen (6 Std., 30 Std.) gerechtfertigt sind.

Nach Ablauf dieser Zeit werden die Suspensionen selbstverständlich bei strengster Asepsis durch sterile 8fache Gaze filtriert, um die sehr störenden Agarteilchen, welche sich gewöhnlich von den Agarflaschen ablösen, zu entfernen. Hierauf werden die Suspensionen 3mal zentrifugiert und jedesmal mit steriler Kochsalzlösung abgewaschen, wobei man immer die Zentrifuge genau 25 Min. unter 5000 Touren laufen läßt. Beim neuerlichen Zusetzen der Kochsalzlösung trägt man jedesmal Sorge, daß der gut zusammengepreßte Niederschlag vollständig wieder in Salzwasser emulgiert wird. Nach scharfem Abpipettieren der 3. Kochsalzlösung werden die mit den abzentrifugierten Bakterienleibern beschickten Zentrifugengläser für 1—$1^1/_2$ Std. in den Thermostat (46°) gebracht und dann genau abgewogen. Die Differenz zwischen dem bis jetzt gefundenen Gewichte und dem Gewichte der schon austarierten Zentrifugengläser entspricht dem Gewichte der halb-

1) Ramon hat inzwischen gezeigt, daß das Formol, ohne die Antigeneigenschaften des Diphtherietoxins zu berühren, die Giftigkeit desselben ganz aufhebt.

2) Die Emulsionen dürfen nicht länger im Brutschrank bleiben, da sie sonst nicht mehr gut aufgeschwemmt werden können.

trockenen Bakterienmasse. Wir haben diese Methode des Abwägens als die einzige genaue jeder anderen vorgezogen.

Zählungen, welche meine Assistenten und ich zu verschiedenen Zeiten und nach verschiedenen Methoden (Wright, Fries) vorgenommen haben, zeigten, daß keine dieser anderen Methoden auch nur annähernd genau ist, so ergibt z. B. 1 mg Typhusbakterienmasse bei gleicher Vorbehandlung und bei gleicher Abzählungsmethode einmal eine Zahl von 1 200 000 000 Bakterienleibern, das andere Mal von 1 600 Millionen. Dagegen ist die Methode der Abwägung der ganzen Masse bis aufs Millligramm genau; ich brauche hier nicht an die Vorzüge dieser Methode, auf welche schon viele andere vor mir (Le Moignic-Sazary u. a.) hingewiesen haben, zu erinnern. Nur muß man selbstverständlich, wenn man gleichwertige Impfstoffe erzeugen will, ganz genau gleichlang und bei gleicher Tourenzahl zentrifugieren und nur Zentrifugengläser von gleicher Größe benützen; ferner muß die auszentrifugierte Masse in den Gläsern gleich hoch stehen und auch immer gleichlang im Thermostaten bei 46° verbleiben. Diese Bedingungen sind in einem gut ausgestatteten größeren Laboratorium leicht zu erfüllen. Die abgewogene Masse wird für jede Bakterienart vorerst je nach Gewicht in 100, 200 oder 300 ccm einer sterilen Kochsalzlösung emulgiert und dann von diesen dichten Emulsionen sofort eine Sterilitätskontrolle gemacht. Es ist unbedingt notwendig, daß die Kontrollen 48 Std. bebrütet werden, denn wir haben nämlich zwar sehr selten, aber ausnahmsweise doch bemerkt, daß nach 24 Std. steril gebliebene Kontrollröhrchen nach 48 Std. doch spärliches Wachstum zeigten. Selbstverständlich sind die gewachsenen Mikroorganismen keine Typhus- oder Paratyphusbakterien, sondern gewöhnliche, während der Manipulationen zufällig eingedrungene Saprophyten. Es erübrigt sich zu bemerken, daß solche Verunreinigungen außerordentlich selten sind, und daß, wenn man schnell und steril in eigens dafür gebauten Räumen arbeitet, die Sterilitätsprobe immer negativ ausfällt, d. h. die Röhrchen steril bleiben. Nach Ablauf von 48 Std. werden die dichten Suspensionen mit so viel steriler Kochsalzlösung verdünnt, daß in 1 ccm 2 mg der betreffenden Bakterienmasse suspendiert ist.

Hat man z. B. 4852 mg Typhus- oder Paratyphusmasse gewonnen, wird man in 2426 ccm Salzwasser emulgieren. Zuletzt werden die verschiedenen Suspensionen in Verhältnis 500 ccm Typhus + 250 ccm Paratyphus B, 125 ccm Paratyphus A und 125 ccm Paratyphus C gemischt und nach Zusatz von 0,20 Proz. Lysol in Flaschen von 10 und 20 ccm abgefüllt. Nach einer letzten Sterilitätsprobe, welche immer negativ ausfällt, kann der Impfstoff sofort zum Gebrauch abgegeben werden.

Freilich kann man auch statt dieses Typhus-Paratyphusimpfstoffes einen reinen Typhusimpfstoff zu 2 mg pro Kubikzentimeter bereiten. Meiner Meinung nach wäre ein solcher Impfstoff in Gegenden, in welchen der Paratyphus selten ist, viel praktischer und nützlicher, da die Immunisierung vielleicht noch sicherer, bestimmt aber dauerhafter wäre. Die während des Krieges auch hier eingeführte Gewohnheit, nur Typhus-Paratyphusimpfstoff zu gebrauchen, ist jedoch bei den Aerzten so fest eingewurzelt, daß sie nur zu einem solchen Impfstoff Vertrauen haben.

Unser Impfstoff ist in Tierexperimenten geprüft, und zwar in bezug auf seine Toxizität, seine Antigenekraft und seine Schutzerzeugung. Nachdem seine geringe Toxizität im Tierexperiment und sein hoher Immunisationswert so bestätigt worden waren, haben wir den Impfstoff

der epidemischen Probe unterzogen, d. h. im endemischen Milieu Schutzimpfungen vorgenommen, wobei die beobachteten Reaktionen genau notiert wurden. Ueber all das soll im folgenden kurz berichtet werden.

Toxizitätsprobe: 4 Kaninchen (1750—1820 Gewicht) wurden 2 ccm dieses Impfstoffes (= 2 mgr Typhus, 1 mgr Paratyphus B, 0,5 mgr Paratyphus A und 0,5 mgr Paratyphus C) intravenös injiziert. Das Kontrolltier (2100gr) erhielt auf gleiche Weise 2 ccm genau derselben Menge (nach Gewicht) eines Impfstoffes, bei dem die Bakterienleiber nicht formolisiert, sondern dreimal gewaschen und durch Wärme (60° $1^1/_2$ Std.) abgetötet worden waren. Nach $3^1/_2$ Std. fiel das Kontrolltier auf die Seite und starb 6 Std. später. Die Sektion ergab nur agonales Oedem der Lungen. Die mit 2 ccm des formolisierten Impfstoffes eingespritzten Kaninchen zeigten dagegen nicht die geringsten Krankheitssymptome. (Alle beide Impfstoffe sind gleichzeitig, aus gleichen Stämmen vorbereitet, die Kulturen waren gleichlang bebrütet.) Schon durch dieses Experiment ist, wie ich glaube, die geringe Toxizität des formolisierten Impfstoffes genügend bewiesen.

Um die Tradition nicht zu verlassen, haben wir auch die Agglutininerzeugung bei den mit dem einen oder mit dem anderen Impfstoffe geimpften Tiere studiert. 2 Kaninchen ungefähr gleichen Gewichtes (1900—2000 g) bekamen subkutan je 2 mg formolisierten Impfstoffes, 2 andere dieselbe Menge des Impfstoffes, bei dem die Bakterien durch Wärme abgetötet worden waren. Nach 9 Tagen wurde das Serum eines jeden Tieres auf Agglutiningehalt geprüft und ausgewertet. Die Resultate waren folgende:

Bei durch Wärme bereiteten Impfstoff:	**Bei durch Formol bereiteten Impfstoff:**
Nr. 42 mit 0,0012 kompl. Aggl. gegen Ty.	Nr. 46 mit 0,00066 kompl. Aggl. gegen Ty.
„ 44 „ 0,0017 „ „ „ „	„ 48 „ 0,0005 „ „ „ „

Dasselbe Experiment wurde mit halber Dosis bei intravenöser Applikation der Impfstoffe an 4 weiteren Kaninchen ca. gleichen Gewichts wie oben) wiederholt. Der Versuch ergab nach 9 Tagen bei

durch Wärme bereiteten Impfstoff:	**durch Formol bereiteten Impfstoff:**
Nr. 72 mit 0,001 kompl. Aggl. gegen Ty.	Nr. 74 mit 0,00025 kompl. Aggl. gegen Ty.
„ 73 „ 0,0006 „ „ „ „	„ 75 „ 0,00033 „ „ „ „

Aus diesen Experimenten geht hervor, daß der Antigenkomplex dieser Bakterien für die Agglutininerzeugung weniger durch die Formolbehandlung, als durch die Wärme geschädigt wird. Selbsverständlich ist damit keineswegs bewiesen, daß die durch Formol behandelten Bakterien auch gegen die Infektion besser schützen, als die durch Wärmeeinwirkung bereiteten, doch ist dadurch ein Anhaltspunkt für die Meinung gegeben, daß vielleicht das Formol auch die anderen Antigenkomplexe der Mikroorganismen weniger schädigt, als dies die Wärme tut.

Um zu prüfen, ob dieser Impfstoff im Tierexperiment schon bei nur einmaliger Einverleibung gegen schwere Infektion schützen kann, haben wir folgende Experimente angestellt. Die Kaninchen Nr. 202, 203, 204 und 308 (Gewicht 2250—2660 g) wurden mit 1 ccm (1 mg TY.) enthaltendem formolisierten Impfstoff, das Kaninchen Nr. 377 mit $^1/_2$ ccm subkutan geimpft und nach 8 Tagen mit 5 ccm einer 24-stünd. Typhusbouillonkultur intraperitoneal infiziert. Ein Kontrolltier Nr. 316 bekommt von derselben Kultur 4 ccm intraperitoneal. Die ersteren blieben am Leben, ohne die geringsten Krankheitssymptome oder auch nur Unbehagen zu zeigen; das Kontrolltier starb nach 7 Std.

Damit war, wie ich glaube, die Schutzkraft des Impfstoffes bei nur einer Impfung im Tierexperimente genügend bewiesen, und ich konnte dazu übergehen, den Impfstoff in endemischem Milieu zu versuchen. Bis jetzt wurden gegen 15000 Leute mit ihm gegen Typhus

immunisiert und dabei bei ca. 1000 Geimpften die Reaktion genau beabachtet.

Der Impfstoff wird nur ein einziges Mal in die Brustgegend oder Arm in der Menge von 1 ccm (Kinder unter 15 Jahren die Hälfte, unter 7 Jahren $^1/_4$ ccm) subkutan eingespritzt, da wir heute wissen, daß eine sichere und feste Immunität erreicht wird, wenn man eine genügende Bakterienmenge auf einmal einverleibt.

Wir können summarisch berichten, daß unser Impfstoff die epidemische Probe voll bestanden hat, da die Geimpften, obwohl sie weiter im endemischen Milieu verblieben, und obwohl keine anderen hygienischen Maßnahmen im Lande getroffen wurden, ganz von Typhus verschont bieben, ausgenommlen 2 Fälle, bei denen am 3. bzw. 6. Tage nach der Schutzimpfung die Krankheit ausbrach, was man nicht der Schutzimpfung zur Last legen kann. Auch die Berichte von anderen Aerzten, welche den Impfstoff angewendet haben, lauten ebenso günstig. Es ist sogar beobachtet worden, daß kleine Dörfer, welche an endemischem Typhus ständig litten, und in denen sich ein Teil der Bevölkerung entweder krank oder unwohl befand, einige Tage nach durchgeführter Schutzimpfung keine Typhusfälle mehr aufwiesen. Hier sollen nur einige Beispiele wiedergegeben werden, die nur den Erfolg der Impfung mit diesem Impfstoffe beweisen. Die genauen Zahlen bleiben einer späteren Veröffentlichung vorbehalten, welche dann erfolgen soll, wenn alle Resultate gesammelt sind, und wenn noch einige Zeit vergangen ist, was für die endgültige Beurteilung des Erfolges notwendig ist.

Im Dorfe Widrowatz z. B. wurden wöchentlich während 3 Monaten 4—6 Typhusfälle klinisch und serologisch konstatiert, während schon $1^1/_2$ Woche nach der Impfung der Typhus aus dem Dorfe vollkommen verschwunden war. Im Dorfe Samarinowatz wurden 3—4, in Radujewatz 2—4, in Duschanowatz dasselbe, in Kobisnitza 4—6 Typhusfälle wöchentlich konstatiert; an diesen Orten sistierte der Typhus vollständig nach durchgeführter Impfung. In Gabrowitza brach eine Typhusepidemie aus, welche sich durch Kontakt weiterverbreitete; in einem Ortsteil hatte jede Familie 2—3 Fälle, zu denen ständig neue hinzukamen, so daß die Epidemie langsam, aber immer mehr um sich griff. Auch hier hörte der Typhus nach erfolgter Impfung vollständig auf. Schließlich will ich noch eine Mitteilung des Chefs der Untersuchungsstation in Belgrad, Dr. Ivanic, mitteilen, nach welcher im Kreise Smederevo regelmäßig 20—40 Typhusfälle wöchentlich vor der Impfung konstatiert wurden, während nachher im ganzen nur noch 2 Fälle auftraten.

Was die Reaktionen anbelangt, sei folgendes erwähnt: Nach kurzdauerndem leichteren Schüttelfrost erhöht sich die Temperatur in 91 Proz. der Fälle zwischen der 4. und 7. Std. nach der Injektion. 7 Proz. weisen keine Reaktion auf, 2 Proz. verspätete Reaktion, welche nach 12—18 Std. beginnt. Die Temperaturerhöhung ist mäßig; von den oben erwähnten 91 Proz. haben 22 Proz. nicht über 38°, 63 Proz. zwischen 38—39°, die übrigen etwas über 39°. Nach 12—24 Std. kehrt die Temperatur fast zur Norm zurück (37,2—37,5°). Bei jenen, die eine verspätete Reaktion aufweisen, ist die Temperaturerhöhung gewöhnlich gering (nicht über 38°), sie dauert aber etwas länger (24 bis 36 Std.). Der Kopfschmerz ist gering, Erbrechen ist nie beobachtet worden, eine gewisse Abgeschlagenheit ist zwar immer vorhanden, doch

dauert diese selten über 24 Std. Von 306 Soldaten, welche in einer kleinen Garnison an einem Nachmittag geimpft worden sind, hat sich am nächsten Tage nur ein einziger krank gemeldet. Arthralgien sind oft beobachtet, sie sind aber sehr mild und vergehen nach 24—36 Std.

Lokal ist geringe Schwellung und Rötung vorhanden. Die Injektionsstelle ist schmerzhaft; Rötungen, die sich über die ganze Brust ausbreiten, sind nur sehr selten und verschwinden immer schnell, dagegen bleibt die Schmerzhaftigkeit über 24 Std. bestehen[1]).

Obwohl nun der Agglutiningehalt des Serums der Geimpften nicht über den Wert der erreichten Immunität Aufschluß geben kann, haben wir doch die Sera von 15 Geimpften am 9. Tage nach der Impfung auf Agglutiningehalt gegen TY. und Paratyphus B geprüft. Vor der Impfung hatten die Sera dieser Leute nur minimale Agglutininwerte, welche 1:20 nicht überschritten, aufgewiesen. Nach der Impfung bewirkte das Serum von 6 Geimpften komplette Agglutination gegen Typhus bei einer Verdünnung 1:400, das von 4 Geimpften bei einer Verdünnung 1:100, bei 1 — nur 1:50. Annähernd die gleichen Resultate ergaben auch die Untersuchungen auf Paratyphus B[2]), ausgenommen 4 Sera, von denen 3 kleinere und 1 einen größeren Wert als bei Typhus ergaben (Typhus 1:50 bis 1:100, Paratyphus B bis 1:200 komplett). Wir können aus diesen Versuchen ersehen, daß die Agglutination bei den mit unserem Impfstoffe Geimpften etwas höhere Werte erreicht, als bei den nach Pfeiffer-Kolle Geimpften.

Schließlich sei erwähnt, daß wir aus altem Impfstoffe Ausstrichpräparate bereitet haben, welche zeigten, daß die Färbbarkeit der Bakterien und ihre Form wohlerhalten waren, woraus man mit Recht schließen kann, daß die Autolyse in diesem Impfstoffe nur gering sein kann.

Da unser Impfstoff erst seit kurzer Zeit in größerem Umfange angewendet wird, so sind wir über die Dauer der bewirkten Immunisierung noch nicht orientiert.

Zusammenfassung.

Es wird über eine neue Methode zur Bereitung eines Typhus-Paratyphusimpfstoffes berichtet, bei der die Abtötung der Bakterien durch Formol bewirkt wird, welches sich nachträglich durch Auswaschen wieder entfernen läßt. Der so bereitete Impfstoff hat sich sowohl im Tierexperiment als auch beim Menschen sehr wenig toxisch erwiesen und immunisiert dabei fest nach einer einzigen Injektion von 2 mg Bakterienleibern. Ueber die Dauer dieser Immunität kann noch kein Urteil abgegeben werden.

1) An dieser Stelle sei eine interessante Episode erwähnt: In einem Gymnasium sind die Schüler der 8. Klasse an einem Nachmittag vor einer Schüleraufführung geimpft worden, da der Arzt vorher nicht davon unterrichtet worden war. Die Reaktion verlief gerade zur Zeit der Vorstellung, der als Zuschauer beobachtende Arzt konnte keinerlei auffälliges Verhalten bei den Theater spielenden Schülern konstatieren. Erst auf Befragen erzählten dieselben, daß sie sich wie leicht beschwipst gefühlt hätten.

2) Bemerkt sei, daß die Agglutination an TY- und Para B-Stämmen geprüft wurde, welche nicht im Impfstoffe vorhanden waren.

Literaturverzeichnis.

1) v. Eisler u. Löwenstein, E., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 61. S. 271. — 2) Friedberger, E., Zur Entwicklung d. Hygiene im Weltkriege, 1919. Jena (Gustav Fischer). — 3) Fries, K. A., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. S. 90. — 4) Hage, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 92. S. 9, — 5) Hetsch u. Kutscher, Klin. Jahrb. Bd. 14. — 6) Hünermann, Ueber Typhusschutzimpfung. Wiesbaden. (J. F. Bergmann). 1916. — 7) Kolle-Wassermanns Handb. d. pathog. Mikroorgan. 2. Aufl. Jena (Gustav Fischer.) — 8) Kuhn, Dtsch. Milit. Ztschr. 1917. (Zit. in Kolle-Hetsch). — 9) Le Moignic u. Sèzary, Nouvelle méthode de vaccination antihyphoidique, le Lipo-Vaccin. T. A. B. Paris. J. Baillière. 1918. — 10) Ramon, G., de l'Inst. Pasteur. S. 38. 1924. — 11) B. Johan jun., Dtsch. Med. Woch. 1915. Nr. 28. — 12) Sacquepée, E., Vaccination antityphique (in Medicaments microbiens. 1912).

Nachdruck verboten.

Das morphologische und biologische Verhalten der Diphtheriebakterien in Mischkulturen.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. v. Wasielewski).]

Von Dr. **A. Adachi,** Nagoya, Japan.

Mischinfektionen verdienen in verschiedener Beziehung unsere besondere Beachtung. Beide an ihr beteiligten Mikroben können zunächst sich gegenseitig beeinflussen, ihre Einwirkung insgesamt oder einzeln steigern oder hemmen; weiter sind sie imstande, sich gegenseitig in ihren Wechselbeziehungen zu ihrem Wirtskörper zu stören. Aber nicht nur dem Kliniker kann ein solches durch Mischinfektionen verändertes Krankheitsbild diagnostische Schwierigkeiten bereiten, auch dem Bakteriologen kann seine Arbeit erschwert werden dadurch, daß sich die Mischbakterien in den Kulturen gegenseitig so stark beeinflussen, daß die bakteriologisch-ätiologische Diagnose erschwert wird.

Von diesem letzten Gedanken gingen wir aus bei unseren folgenden Versuchen über die Beeinflussung der Diphtheriebakterien durch Bakterien, mit denen diese z. T. auf den Tonsillen vorkommen, oder mit denen wir sie zu Versuchszwecken mischten. Hier liegt ja bei der üblichen Art der bakteriologischen Diphtheriediagnose mittels Schmierplatte die Gefahr eines Ueberwucherns der Diphtheriebakterien durch die Begleitbakterien besonders nahe. Dieses Ueberwuchern der einen durch die andere Bakterienart ist die roheste Form der gegenseitigen Beeinflussung, sie kann gewiß auch eine feinere sein, indem sie sich auf bestimmte biologische Fähigkeiten erstreckt. Bei den Diphtheriebakterien könnte z. B. die Fähigkeit der Polkörperchen-, der Säure- oder der Toxinbildung beeinflußt, könnten ihre Wuchsformen geändert sein.

Die Beobachtung, daß bei gleichzeitigem Vorkommen von Diphtheriebakterien und Streptokokken der Krankheitsverlauf oft ein besonders schwerer sein kann, hat bereits Loeffler (1884), sowie Roux u. Yersin (1890) beschäftigt. Desgleichen haben Barbiers (1891), v. Schreider (1892), Funk (1894), Mya (1894), Bernheim (1894/97), v. Dungern (1896/97), Hilbert (1897/98), Fahr (1916), Schley u. S. Meyer (1919) und Ladendorf (1921) diese Frage bearbeitet. Ihre Versuchsergebnisse und die Anschauungen, die

sie sich davon ausgehend über diese Erscheinung gebildet haben, gehen zwar noch sehr weit auseinander, das eine aber scheint doch fest zu stehen: bei einer Mischinfektion von Diphtheriebakterien und Streptokokken ist das Krankheitsbild meist ein schweres. Freilich, wodurch diese Verschlimmerung eintritt, ob durch ein Empfänglicherwerden des Tieres durch das eine für das andere Bakterium, durch Giftiger- oder Virulenterwerden der Streptokokken oder der Diphtheriebakterien, oder schließlich durch Bildung eines modifizierten Diphtheriegiftes (Fahr), das bleibt noch immer unentschieden.

Neben den Streptokokken sollen aber noch andere Mikroben die Diphtheriebakterien beeinflussen können: so Staphylokokken nach Mya, Bernheim (1894), Schiötz (1909), de Witt (1912), Reuter (1919) und Deussing (1919); Pneumokokken nach Deussing; Friedländerbakterien nach Lesbre (1923); Bact. acid. lact. nach Wood (1913); und schließlich Bact. coli nach van der Reis (1921). Da wir auch Soor nicht selten neben Diphtheriebakterien fanden, zogen wir auch diesen Pilz in den Kreis unserer Versuche.

Da eine Klärung der Toxizitätsfrage bei Mischinfektionen nur mit Hilfe eines sehr großen Tiermaterials möglich ist, wie es uns nicht zur Verfügung stand, die Giftigkeit aber der Reaktion der Bouillon in gewissem Maße parallel gehen soll, so suchten wir zunächst in der Aenderung des Säuregrades in der Kulturbrühe einen Anhalt für die gegenseitige Beeinflussung der Diphtheriebakterien und der Mischbakterien zu bekommen. v. Schreider fand die Zuckerzersetzung in Rein- und Mischkulturen nahezu konstant; aber in Hilberts Versuchen trat die alkalische Reaktion früher ein und erreichte höhere Grade als in Reinkulturen, was er auf rascheres Wachsen der Diphtheriebakterien zurückführt.

Zu unseren Versuchen verwandten wir verschiedene Diphtheriestämme, zu denen wir wieder verschiedene Streptokokken-, Staphylokokken-, Coli-, Soor- und Friedländer-Stämme gaben. Als Nährboden benutzten wir Traubenzucker- und Witte-Peptonbouillon. In den Rein- und Mischkulturen wurde die Wasserstoffionenkonzentration nach 24—216stünd. Bebrütung mittels der Indikatorenmethode von Michaelis bestimmt. Wachstumskontrollen machten wir durch Aussaat auf Tellur- und Agarplatten, sowie in grober Form mittels mikroskopischer Präparate.

Von einer Wiedergabe der Protokolle über diese Versuche kann abgesehen werden, da die p_H-Zahlen der Misch- von denen der Diphtherie-Reinkulturen nur wenig abwichen, und wenn sie es in etwas stärkerem Grade taten, so geschah dies infolge des Ueberwucherns der Mischbakterien z. B. von Coli und infolge der Zuckerzersetzung durch diese Mikroben.

In den weiteren Versuchen schlossen wir uns der Technik von Nicolai (1922) an, indem wir auf Loeffler-Serum-Platten strichweise erst das eine und dann rechtwinklig dazu das andere Bakterium impften. Die Striche wurden in der 1. und 2. Versuchsserie (Protokoll I—III) in der Reihenfolge 1—3 gezogen, ohne daß die Oese zwischendurch neu beschickt wurde. Dadurch wurde eine gewisse Abstufung der Keimzahl in den einzelnen Strichen erreicht (Prot. I S. 32).

In der ersten Serie wurden die Diphtheriebakterien über die anderen Bakterien, also zu zweit, ausgestrichen, in der zweiten war es umgekehrt. In die Protokolle wurde nur das Untersuchungsergebnis im

Protokoll I.

Kreuzweises Impfen von Diphtherie über Mischbakterien.

Untersucht Kreuzpunkt 2/2.

Mischkultur Di. mit:		Staph.		Strept.		Coli		Soor		Friedl.		acid. lact.	
Wachstum von		Di.	Sta.	Di.	Str.	Di.	Coli	Di.	So.	Di.	Fr.	Di.	a. l.
A. Di-Stamm 6895	nach 24 Std.	3	3	4	±	3	4	1	±	2	3	2	4
	„ 48 „	2	4	4	±	2	4	2	2	±	4	—	4
	„ 72 „	1	4	4	±	2	4	2	2	±	4	—	4
B. Di-Stamm 817	nach 24 Std.	1	4	.		1	4	4	±	.		1	4
	„ 48 „	1	4	.		1	4	4	±	.		—	4
	„ 72 „	±	4	.		—	4	4	1	.		—	4

Protokoll II.

Kreuzweises Impfen von Mischbakterien über Diphtherie.

Di-Stamm 6895: A. Kreuzpunkt 2/2, B. „ 3/3.

Mischkult. Di. mit:	Staph.		Strept.		Coli		Soor		Friedl.		acid. lact.	
Wachstum von:	Di.	Sta.	Di.	Str.	Di.	Coli	Di.	So.	Di.	Fr.	Di.	a. l.
A. Nach 24 Std.	1	4	4	1	1	3	4	±	1	4	4	4
„ 48 „	±	4	4	1	±	4	4	±	±	4	1	4
„ 72 „	±	4	4	1	—	4	4	1	±	4	—	4
B. Nach 24 Std.	1	4	3	2	2	3	4	1	±	4	2	4
„ 48 „	—	4	4	±	—	4	4	1	±	4	±	4
„ 72 „	—	4	4	±	—	4	4	1	±	4	—	4

Protokoll III.

Kreuzweises Impfen von Diphtherie über Mischbakterien, je 1 Oese einer Verdünnung 50 Mill. in 1 ccm.

Untersucht Kreuzpunkt 1/1.

Mischkult. Di. mit:	Staph.		Strept.		Coli		Soor		Friedl.		acid. lact.	
Wachstum von:	Di.	Sta.	Di.	Str.	Di.	Coli	Di.	So.	Di.	Fr.	Di.	a. l.
Nach 24 Std.	—	1	±	1	1	1	1	±	1	2	1	1
„ 48 „	—	1	1	1	±	1	1	1	1	2	±	1
„ 72 „	±	1	1	1	±	1	1	1	±	2	—	1
„ 96 „	±	1	1	1	±	1	1	1	±	2	—	1
„ 144 „	±	1	1	1	—	1	.		.		.	

mikroskopischen Präparat von bestimmten Punkten aufgenommen, die als Bruch nach der Nummer des zuerst und zu zweit angelegten Impfstriches bezeichnet wurden. Mit den Zahlen in den Protokollen bezeichnen wir die Reichlichkeit der in dem mikroskopischen Bilde vorhandenen Bakterienart. Es läßt sich so natürlich nur grob das zahlenmäßige Verhältnis, in dem beide Bakterienarten in dem mikroskopischen Präparate zueinander stehen, feststellen, aber es genügt, um die dabei hervortretenden prinzipiellen Unterschiede im Wachstum zu kennzeichnen.

Protokoll I und II zeigen, daß Staphylokokken, Coli- und Friedländer- und Milchsäurebakterien das Wachstum der Diphtheriebakterien hemmen. Selbst wenn anfangs noch von jeder Art gleichviel vorhanden gewesen ist, so treten nach 48 und 72 Std. die Diphtheriebakterien in den Präparaten bald stark zurück, ja sie können bisweilen

überhaupt nicht mehr auffindbar sein. Dagegen zeigen sich auch Unterschiede in der Stärke dieser Beeinflussung zwischen den einzelnen Stämmen.

An den Kreuzpunkten werden natürlich immer diejenigen Bakterien in der Mehrzahl sein, die zuletzt, also über die anderen, geimpft wurden, in Protokoll II also mehr Mischbakterien als in Protokoll I. Es zeigt sich auch, wie dieses Zahlenverhältnis bei der Aussaat das Ergebnis beeinflußt, indem bei Ueberzahl die Staphylokokken und Colibakterien bereits nach 48 Std. die Diphtheriebakterien gänzlich unterdrückt haben können. Während wir in Serie 1 und 2 von jeder Bakterienart eine Oese genommen hatten, benutzten wir in Serie 3 eine 50 000 000 Keime im ccm enthaltende Bakterienaufschwemmung zum Ausstreichen. Bei dieser dünnen Aussaat ist anscheinend das Mengenverhältnis für die Diphtheriebakterien günstiger, erst nach 144 Std. sind sie den Colibakterien gewichen.

Gegen Staphylokokken kommen die Diphtheriebakterien nur langsam auf, können sich aber dann neben ihnen halten (Prot. III).

Soor wächst in Gegenwart von Diphtheriebakterien nur langsam; nach 24 Std. gedeihen beide Arten gut nebeneinander. Das Gleiche gilt für Streptokokken und Diphtherie; doch könnte es nach Prot. II den Anschein haben, als ob Streptokokken unter der Gesellschaft der Diphtheriebakterien leiden.

Eine feinere Abstimmung in dem Mengenverhältnis der Bakterien zueinander ermöglichte uns das folgende Verfahren.

Fährt man mit der Diphtherie-Oese auf der Loefflerplatte über die drei Striche der Mischbakterien, so nimmt man jedesmal auch Material von den Mischbakterien an der Oese mit, das beim Weiterimpfen dann auf dem Diphtheriestrich liegen bleibt. Es wachsen dann also auch zwischen den Kreuzpunkten Mischkulturen. Und zwar werden, je öfter wir mit der Diphtherieöse über den Impfstrich der Mischbakterien gefahren sind, desto mehr Mischbakterien sich unter den Diphtheriebakterien finden: im 1. Strich werden es am wenigsten, im letzten am meisten sein.

Wir untersuchten nun auf den Platten der 4. und 5. Serie die Impfstriche an den Stellen, wo sie keinmal, 4 und 8mal (Prot. IV) und wo sie 1—5mal (Prot. V) über die Mischkultur hinweggegangen waren.

Protokoll IV.

Di. +	Wachstum von	Der Diphtherieimpfstrich ging über die Mischbakterien.								
		0mal			4mal			8mal		
Staph.	Di.	4	4	4	±	±	±	±	+	—
	Staph.	—	—	—	4	4	4	4	4	4
Strept.	Di.	4	4	4	1	±	±	±	±	±
	Strept.	—	—	—	4	4	4	2	4	4
Coli	Di.	4	4	4	1	—	—	1	—	—
	Coli	—	—	—	4	4	4	4	4	4
Soor	Di.	4	4	4	3	4	4	3	3	4
	Soor	—	—	—	1	3	4	1	4	4
Friedländer	Di.	4	4	4	1	±	2	1	1	1
	Friedl.	—	—	—	4	4	4	4	4	4
	nach	24	48	72	24	48	72	24	48	72 Std.

Protokoll V.

Di. +	Wachstum von	Der Diphtherieimpfstrich ging über die Mischbakterien																		Bemerkungen
		0mal			1mal			2mal			3mal			4mal			5mal			
Staph.	Di.	4	4	4	1	1	1	1	1	±	1	±	±	1	—	—	—	—	—	Di.-Stamm
	Sta.	—	—	—	2	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	6895
Strept.	Di.	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	dgl.
	Str.	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Coli	Di.	2	4	4	1	1	±	±	±	±	±	±	±	?	—	—	—	—	—	„
	Coli	—	—	—	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Soor	Di.	2	4	4	3	4	4	2	4	4	2	4	4	2	4	4	2	4	4	„
	Soor	—	—	—	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	
Friedl.	Di.	4	4	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	±	1	±	±	±	±	Di.-Stamm
	Fr.	—	—	—	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	817
B. acid. lact.	Di.	4			3			3			3			3			3			Di.-Stamm
	acid. lact.	—			3			3			4			4			4			6690
Strept.	Di.	4	4	4	2	4	4	2	3	4	2	3	3	2	2	2		.		Di.-Stamm
	Str.	—	—	—	±	1	±	2	2	±	2	2	2	2	2	2		.		817
	nach	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	

Das Ergebnis ist, daß die Diphtheriebakterien, je stärker sie mit Staphylokokken, Coli und Milchsäure- und Friedländer-Bakterien sich vermischen und je längere Zeit sie zusammenwachsen, desto mehr von den Mischbakterien zurückgedrängt werden, bis sie überhaupt — mit Ausnahme der Friedländer-Mischkultur — nicht mehr nachweisbar sind. Soor und Streptokokken haben auch hier keinen schädigenden Einfluß auf die Diphtheriebakterien.

Protokoll VI.

Di.	Wachstum von	Der Diphtherieimpfstrich ging über die Mischbakterien (1 Oese in 5 ccm NaCl-Lösung)															
		0mal			1mal			2mal			3mal			4mal			
Staph.	Di.	2	4	4	1	1	±	?	—	—	±	—	—	—	—	—	
	Sta.	—	—	—	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Strept.	Di.	3	4	4	3	4	4	3	4	4	3	4	4	3	4	4	
	Str.	—	—	—	±	±	±	±	±	1	1	1	1	1	2	2	
Coli	Di.	3	4	4	±	±	±	±	—	—	±	—	—	±	—	—	
	Coli	—	—	—	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Soor	Di.	3	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	Soor	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Friedl.	Di.	4	4	4	2	3	1	1	2	1	1	1	±	1	1	—	
	Fr.	—	—	—	2	4	4	2	3	4	3	4	4	4	4	4	
	nach	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	Std

Protokoll VI gibt einen weiteren Versuch (Serie 6) wieder, bei dem die Diphtherie unverdünnt, die Mischbakterien aber verdünnt (eine Oese in 5 ccm NaCl-Lösung) verwendet wurden. Und da auch hier die Resultate im wesentlichen die gleichen sind wie in den ersten Serien, so gewinnen die dort gewonnenen Ergebnisse an Zuverlässigkeit trotz der an sich groben Technik.

Wir ergänzten diese Versuche, die mit festen Nährböden und einer Kontrolle der Ergebnisse mittels gefärbten mikroskopischen Präparaten arbeiteten, durch solche in flüssigem Nährboden und einer Kontrolle des Wachstums in ihm durch Verstreichen einer Oese daraus mit Drigalski-Spatel auf festem Nährboden, und zwar wurden zur Zählung der Diphtheriebakterien Tellurplatten, der Mischbakterien Agarplatten benutzt (Prot. VII und VIII).

Es wurden Di- und Mischbakterien in Traubenzuckerbouillon geimpft und sofort diese Einsaat gezählt. $4 - \pm$ bezeichnen die Stärke des Wachstums nach der Bebrütung, wobei $4 = \infty$, $\pm = < 10$ bedeutet. Die anderen Werte liegen dazwischen. Auch hier sind wieder nicht die absoluten Zahlen, sondern das Verhältnis beider Bakterien zueinander maßgebend.

Protokoll VII.

Di. +	Einsaat Di. : Mischb.	Wachstum von	Wachstum in Traubenzuckerbouillon nach Std.				Di.-Stamm
			24	48	72	96	
Staph.	150 : 170	Di.	4	3	±	±	6895
		Staph.	4	4	4	4	
„	50 : 220	Di.	3	3	2	.	817
		Staph.	4	4	4	.	
Strept.	150 : 20	Di.	1	±	1	1	6895
		Strept.	1	1	2	2	
„	275 : 275	Di.	2	.	3	2	817
		Strept.	1	.	2	1	
Coli	150 : 100	Di.	2	2	1	1	6895
		Coli	4	4	4	4	
„	30 : 30	Di.	±	.	±	—	817
		Coli	4	.	4	4	
Soor	150 : 100	Di.	1	4	4	4	6895
		Soor	2	4	4	4	
„	275 : 350	Di.	3	.	3	3	817
		Soor	±	.	3	3	
Friedl.	275 : 175	Di.	±	.	2	1	817
		Friedl.	4	.	4	4	
acid. lact.	250 : 200	Di.	1	±	±	—	6895
		acid. lact.	3	4	4	4	

Protokoll VIII.

B. coli + Diphtherie in fallenden Mengen in Traubenzuckerbouillon.

Einsaat Coli : Di.	Wachstum von	Wachstum nach Stunden			
		24	48	72	96
00 : 00	Di.	4	4	4	4
	Coli	4	4	4	4
00 : 750	Di.	4	4	4	1
	Coli	4	4	4	4
00 : 175	Di.	1	1	1	—
	Coli	4	4	4	4
00 : 23	Di.	1	—	—	—
	Coli	4	ç	4	4

Das Ergebnis dieser Versuche bestätigt im großen und ganzen die auf festem Nährboden gewonnenen Befunde. Es fiel dabei auf, daß wiederholt die Diphtheriebakterien in Mischkultur mit Staphylokokken sich anfangs rascher vermehrten als in den Reinkulturen; an dem späteren Ueberwuchern durch die Staphylokokken änderte dieses anfänglich rasche Wachstum allerdings nichts. Protokoll VIII gibt einen Versuch wieder, bei dem Coli-Bakterien mit fallenden Mengen Diphtheriebakterien zusammengebracht wurden, und der deutlich den Einfluß des Mengenverhältnisses auf das Ueberwuchern auch in flüssigem Nährboden zeigt.

Ueberblicken wir unsere gesamten in Mischkulturen gewonnenen Ergebnisse, so sehen wir, daß uns die verschiedenen Versuchsanordnungen im wesentlichen immer wieder die gleichen Ergebnisse gebracht haben.

Am leichtesten vermag Bact. coli die Diphtheriebakterien zu überwuchern, wobei es von dem quantitativen Verhältnis abhängt, wie lange es dauert, bis die Diphtheriebakterien im Präparat oder kulturell nicht mehr nachweisbar sind. Bact. coli und Bact. acid. lact. spielen freilich weder bei der Diphtherieerkrankung noch der Diphteriediagnose eine Rolle, anders aber ist das bei Staphylokokken, Streptokokken, Soor und Friedländer. Soor und Friedländer, das sagen uns unsere Versuche, werden uns bei dem zur bakteriologischen Diphtheriediagnose benutzten Schmierplattenverfahren nicht stören. Bei Staphylokokken und Friedländer aber kann es auf das Verhältnis von Misch- zu Diphtheriebakterien ankommen, ob uns ein Diphtherienachweis gelingt. In den Versuchen, die Neisser 1913 veröffentlichte, waren Diphtheriebakterien selbst bei Verwendung von Einsaatgemischen von 1:2000 Staphylokokken noch nachweisbar. Unsere Ergebnisse weisen aber doch auf gewisse Grenzen des Schmierplattenverfahrens hin, die freilich für die Praxis der bakteriologischen Diagnose keine Rolle spielen.

Die Reagenzglasversuche besagen aber zunächst noch nichts über das Verhalten der verschiedenen Bakterien auf den Tonsillen zueinander. Die öfter beobachtete deletäre Wirkung der Streptokokken-Diphtherie-Mischinfektion beruht auf anderen im Reagenzglase nicht hervortretenden biologischen Faktoren. Klinische Beobachtungen über Mischinfektionen mit Soor sind unseres Wissens nirgends niedergelegt; nach den Reagenzglasversuchen scheinen sie ohne Belang. Anders liegen die Verhältnisse bei den Staphylokokken- und Pneumobakterien-Mischinfektionen, auf die wir kurz eingehen müssen.

Eine günstige Beeinflussung der Diphtherieerkrankung durch Staph. pyog. aur. sowie Friedländer-Bakterien ist verschiedentlich beobachtet worden (z. B. von Gaté, Leboef und Papacostas 1922) und daraufhin von Schiötz 1909, de Witt 1912 und Lesbre 1923 zu einer Verdrängungstherapie bei Diphtheriekranken und -Bazillenträgern verwendet worden. Wood 1914 benutzte zu gleichem Zwecke einen Spray mit Bact. acid. lact.; van der Reis 1921 einen solchen mit Bact. coli. Alle diese Versuche haben auch auf Grund unserer Versuchsergebnisse eine gewisse Berechtigung, wenn auch die Erfahrungen der Nachuntersucher (z. B. Catlin, Scott u. Day 1911, F. L. Wright 1913, Rolleston 1914, Fay 1914 sowie Pesch u. Zschokke 1922) mit diesen Methoden in der Praxis meist schlechte sind. Bei Benutzung von Bacterium coli und acid. lact. kann

uns das kaum wundernehmen, da diese Mikroben in der Mundhöhle nicht oder nur schlecht gedeihen, die biologischen Voraussetzungen dieser Behandlungsmethoden also falsch sind.

Des weiteren galten unsere Versuche der Frage, ob durch Wachsen in Mischkulturen Diphtheriebakterien morphologisch verändert würden, wobei wir die Frage nach der Virulenz solcher veränderter Formen unberücksichtigt lassen mußten. Es sei nur erwähnt, daß die alte Erfahrung, die Virulenz sei unabhängig von der Morphologie und Polkörperchenbildung durch neue Versuche von Jordan und seinen Mitarbeitern gestützt wird (1922).

Was zunächst die zahlreichen Versuche, die wir über Polkörperchenbildung machten, anbelangt, so können diese Ergebnisse kurz zusammengefaßt werden: durch das Wachsen in Mischkulturen mit Streptokokken, Staphylokokken, Soor, Coli und Friedländer-Bakterien wurde in unseren Versuchen die Polkörperchenbildung weder zeitlich noch quantitativ beeinflußt.

Weitere morphologische Untersuchungen galten der Frage der Fadenbildung der Diphtheriebakterien in Mischkulturen. Ueber die Ergebnisse wird eine weitere kurze Mitteilung folgen.

Die bisherigen Versuche haben zunächst folgendes ergeben:

1) Durch das Wachsen in Mischkultur werden Säure- und Polkörperchenbildung der Diphtheriebakterien nicht beeinflußt. — 2) Die bakteriologische Diphtheriediagnose kann durch eine reichliche Mitaussaat von Staphylokokken und Friedländer-Bakterien erschwert werden; Streptokokken und Soor stören bei ihr nicht. — 3) Wie die klinische Beobachtung, daß bei Mischinfektion der Verlauf der Diphtherieerkrankung ein schwererer ist, zu erklären ist, dafür bieten unsere Versuche keinen Anhalt. — 4) Sie lassen aber eine Verdrängungstherapie durch Coli, Bact. acid. lact., Staphylokokken und Pneumokokken theoretisch als berechtigt erscheinen; aus biologischen Gründen scheiden aber die Coli- und die Bact. acid. lact.-Behandlung praktisch aus.

Literatur.

Barbier, De quelqus associations microbiennes dans la diphtérie. (Arch. de méd. expérim. 1899. Mai. zit. Bernheim.) — Bernheim, J., Ueber die Mischinfektion bei Diphtherie. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 18. 1894. S. 529.) — Ders., Ueber die Rolle der experimentellen Mischinfektion mit Diphtheriebakterien. (Arch. f. Hyg. Bd. 28. 1897. S. 138.) — Catlin, Scott a. Day, Successful use of the staphylococcus-spray on diphtheria carriers. (Journ. Amer. med. Assoc. Vol. 67. 1911. p. 1952.) — Deußing, R., Zur Kenntnis der Mischinfektion bei Diphtherie. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 88. 1919. S. 346.) — Dungern, v., Steigerung der Giftproduktion des Diphtheriebazillus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 19. 1896. S. 137.) — Ders, Die Bedeutung der Mischinfektion bei Diphtherie. (Zieglers Beitr. zur path. Anat. Bd. 21. 1897. S. 104.) — Fahr, Th., Beiträge zur Diphtheriefrage. (Virch. Arch. Bd. 221. 1916. S. 38.) — Fay, J., Staphylokokkusspray bei Diphtheriebazillenträgern. (California State Journ. of Med. Vol. 5. 1913; ref. Centralbl. f. Bakt., Ref. Bd. 60. 1914. S. 371.) — Funk, Experimentelle Studien über die Frage der Mischinfektion bei Diphtherie. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 17. 1894. S. 467.) — Gaté, J., Leboef et Papacostas, Fréquence rélative dans les angines de l'association „Bacille de Löffler-Pneumobacille". (Compt. Rend. Biol. T. 86. 1922. p. 929.) — Hilbert, Ueber Wesen und Bedeutung der Mischinfektion. (Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 59. 1897.) — Ders., Ueber die Steigerung der Giftproduktion der Diphtherie. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 29. 1898. S. 157.) — Jordan, J. H., and Smith a. Kingsbury, Pathogenicity of the diphtheria group. (The Lancet. 1922. 18. Nov. p. 1052.) — Ladendorff, H., Ueber die Steigerung der Giftwirkung klinisch avirulenter Diphtheriebazillen durch die Symbiose mit Streptokokken bei Meerschweinchen. (Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 22.

1921. S. 151.) — Lesbre, Destruction du bacille de Löffler chez les porteurs sans par inoculation pharyngée de pneumobacilles. (Compt. Rend. Biol. T. 88. 1923. p. 227.) — Loeffler, Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen usw. (Mitteil. aus d. Kais. Ges.-Amt. Bd. 2. 1884.) — Meyer, S., Experimentelle Studien über den Einfluß antitoxischen und normalen Pferdeserums auf die Infektion des Meerschweinchens mit lebenden Diphtheriebazillen, mit Mischkulturen von Diphtheriebazillen und Streptokokken sowie auf die Vergiftung mit reinem Diphtherietoxin. (Münch. med. Woch. 1919. S. 873.) — Mya, G., Ueber die Pathogenität der Diphtherieinfektion. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Bd. 15. 1894. S. 682.) — Neisser, M., Bakteriologie der Diphtherie. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. 1913. S. 1*. — Nicolai, J., Ueber die Beeinflussung des Wachstums von Diphtheriebakterien auf künstlichen Nährböden durch Mischinfektion. [Inaug.-Diss.] Rostock 1922. — Pesch, K., u. Zschokke, O., Versuche über Verdrängung von Diphtheriebakterien durch Coli-Bakterien in der Nase von Keimträgern. (Münch. med. Woch. 1922. S. 1276.) — Van der Reis, Die künstliche Ansiedlung von Bakterien in Mund- u. Rachenhöhle. (Ibid. 1921. S. 325.) — Reuter, Ueber die Virulenzsteigerung der Diphtheriebazillen durch Staphylokokken usw. [Inaug.-Diss.] 1919. — Roux et Yersin, Recherches sur la diphtérie (3. Mém.). (Ann. Inst. Past. T. 4. 1890. p. 385.) — Schiötz, A., Uskadeliggörelse of Infektionsbärere ved Difteri. (Ugeskrift f. Läger. 1909. S. 1382; ref. Hyg. Rundsch. Bd. 21. 1911. S. 11.) — Schley, Ueber die Virulenzsteigerung des Diphtheriebazillus durch den Streptokokkus usw. Inaug.-Diss. Leipzig 1919. — Schreider, M. v., Ueber Mischkulturen von Streptokokken und Diphtheriebazillen. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 12. 1892. S. 289.) — de Witt, L. M., Report of some experiments on the action of Staphylococcus aureus on the Klebs-Löffler-Bacillus. (Journ. infect. Dis. Vol. 10. 1912. p. 24.) — Wood, H. B., Lactic acid bacillus spray for diphtheria. (Journ. Americ. med. Assoc. Vol. 61. 1913. p. 392.) — Wright, F. L., Results of Schiötz method in ridding diphtheria cases and carriers of diphtheria bacilli in the state agricultural and industrial school. (Ibid. Vol. 61. 1913. p. 26.)

Nachdruck verboten.

Ueber Milchsäurestreptokokken und Pneumokokken.

[Aus dem Untersuchungsamt für ansteckende Krankheiten beim Hyg. Institut in Kiel (Leiter: Prof. Dr. med. Ludwig Bitter).]

Von **Ludwig Bitter** und **Leo Buchholz.**

Das Gebiet der Milchsäurestreptokokken ist in den letzten Jahren von verschiedenen Gesichtspunkten aus bearbeitet worden. Einmal waren es Milchwirtschaftler (Weigmann 28, Orla-Jensen 15) und Tierärzte, die besonders eine Klärung praktisch wichtiger Fragen der Milchhygiene und rationellen Milchwirtschaft durch systematische Bearbeitung der primären und sekundären Milchflora anstrebten und in diesem Zusammenhang auch der Streptococcus lacticus-Gruppe ihre besondere Aufmerksamkeit widmeten. [Ausführliche Literatur siehe bei Steck 25 und Orla-Jensen.] Neben deutschen Autoren (Seitz 23, Sperling 24, Heim 7 waren es in der Mehrzahl amerikanische, die sich um die Klarstellung der morphologischen und biologischen Eigenschaften des Strept. lacticus bemühten. Durch Beobachten des auf verschiedenen Nährböden, besonders Blutagarplatten, charakteristischen Wachstums gelang es, eine Artunterscheidung anderen Streptokokkenarten gegenüber und innerhalb der Strept. lacticus-Gruppe zu ermöglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in den Arbeiten von Puppel (18), Saito (20) u. a. Es muß hier gleich festgestellt werden, daß unter dem Namen Strept. lacticus die von Kruse beschrie-

bene Gruppe von Milchsäurestreptokokken, die von anderer Seite auch als Strept. acidi lactici (Grotenfeld 6) oder Strept. lactis (Heim) bezeichnet wurde, zu verstehen ist. In den letzten Jahren wurde hauptsächlich von amerikanischen Autoren (Jones 11, Avers 1, Fish Burky 5, Salter 21, Brown 3, Holmann 9, Heinemann 8 u. a.) die Beobachtung über die Fähigkeit der Kohlehydratspaltung mitherangezogen, mittels der es gelang, Typenunterschiede innerhalb der Strept. lacticus-Gruppe festzustellen. In allerjüngster Zeit gab nun Heim an, daß es möglich ist, mittels des für den Strept. lacticus spezifischen Verhaltens in der Lackmusmilch mit Sicherheit die Zugehörigkeit eines Streptokokkus zur Lacticus-Gruppe zu erkennen. Ziel unserer Arbeit war es nun, angeregt durch die Beobachtungen, die von Bitter anläßlich der Abgabe eines Gutachtens über die Beschaffenheit des von den Angler-Milchwerken hergestellten Milchpulvers „Storchenmilch" gemacht wurden, eine Trennung etwaiger Typen der Milchsäurestreptokokken nach ihrem morphologischen und biologischen Verhalten, insbesondere in Lackmusmilch und verschiedenen flüssigen Kohlehydratnährböden, sowie auf der Ziegenblutagarplatte, zu versuchen. Außerdem sollte den Beziehungen der genannten Mikroorganismen zum Pneumococcus und Strept. pleomorphus und mucosus nachgegangen werden, wozu uns die Heranziehung des Tierversuches an der weißen Maus unumgänglich notwendig erschien.

Die zur Untersuchung herangezogenen Stämme sind die von uns aus dem Milchpulver isolierten 3 typischen Stämme, einige Stämme von „Strept. acidi lactici" und Stamm „Cremoris", die uns in freundlicher Weise das hiesige Forschungsinstitut für Milchwirtschaft überließ, sodann solche aus dem Material von menschlichen Krankheitsfällen isolierte, das dem Untersuchungsamt des Institutes eingeschickt wurde; weiterhin aus Frauenmilch und Säuglingsstuhl gezüchtete Stämme, insgesamt 52.

Zur Isolierung aus dem Milchpulver gingen wir folgendermaßen vor: Aus einem mit einer Oese des Milchpulvers beimpften Bouillonröhrchen wurden nach 24stünd. Aufenthalt im Brutschrank je eine Oese auf Ziegenblutagarplatte und Chinablauagar ausgesät. Nach 24stünd. Bebrütung bei 37° konnten wir folgende 3 Typen unterscheiden, die nach ihren kulturellen Eigenschaften kurz beschrieben werden sollen:

Typ I. Auf der Blutagarplatte wuchsen ziemlich große (bis $^1/_3$ mm große) weiße, kuppelförmige, saftige, staphylokokkenartige Kolonien, die eine schwärzliche Verfärbung des Nährbodens in der nächsten Umgebung der Kolonien machten. Auf Chinablauagar waren die Kolonien klein, saftig, hellblau.

Typ II stellte sich auf der Blutplatte als kleinere bis größere flache Kolonien dar, die mit starker Vergrünung und Aufhellung wuchsen. Die Kolonie ist an sich mehr oder weniger weiß, saftig. Diese Mikroorganismen konnten auf Chinablauagar wieder in zwei Unterabteilungen zerlegt werden. Die einen, Typ IIa, präsentierten sich als kleine, ziemlich spitze, mehr oder weniger tiefblau wachsende, ziemlich saftige Ansiedelungen, die anderen, Typ IIb, bildeten kuppelförmige, auf den ersten Blick tröpfchenartig aussehende, kleine bis mittelgroße, tiefblaue Kolonien, die nicht selten den Nährböden so fest anhafteten, daß sich das Untersuchungsmaterial nur mit Mühe von denselben entnehmen ließ. Auffällig erschien, daß sie oft eine Ein-

ziehung des Nährsubstrates bewirkten und daß bei längerem Stehen die Kuppelform in eine Kokardenform überging.

Typ III wuchs auf Blutagar als große runde, tröpfchenartige Kolonie, die eine ausgesprochene Vergrünung und Aufhellung des Nährbodens bewirkte. Auf der Chinablauplatte sah man große runde, schleimige tiefblaue Kolonien. Bei diesem Typ fiel besonders die kolossale Vergrößerung der Kolonie nach 48 Std., sowohl bei Brutschrank- als auch bei Zimmertemperatur auf. Die Kolonien erreichten nicht selten einen Durchmesser von 0,5 cm. Das Ausstrichpräparat der Kulturen von Typ I und II zeigte die für Strept. lacticus charakteristischen Diplolanzettkokken in vorzugsweiser Lage zu zweien. Auch in den nicht selten anzutreffenden Ketten war die Diplolagerung immer deutlich sichtbar. Bei Typ I war außerdem die Größe der Kulturkokken sehr verschieden. Man konnte Stämme mit verhältnismäßig großen, plumpen und mittelgroßen bzw. zarten unterscheiden. In den häufig anzutreffenden kurzen oder langen Ketten fanden sich Lanzettformen und mehr oder weniger rundliche Formen; aber auch stäbchenförmige in recht verschiedenen Größen lagen beieinander. Das Bild glich durchaus dem seit Anfang 1918 als Begleitbakterium der letzten Grippeepidemie bekannten Diplostreptococcus pleomorphus. Auf gewöhnlichem Nähragar war sowohl bei der Strich- wie auch der Stichkultur das Wachstum aller 3 Typen ein äußerst zartes, auf 2proz.

Tabelle I.

Typ I. Blutagar: ziemlich große weiße, kuppelförmige, saftige, staphylokokkenartige Kolonien mit schwärzlicher Verfärbung.
Chinablauagar: klein, spitz, saftig, hellblau.

Stamm	Herkunft	Hämolyse	Bouillon 37°		Milchzuckerbouillon 37°	
			12 Std.	24 Std.	12 Std.	24 Std.
1, 39, 40	Milchpulver	.	getrübt	getrübt mit mäßigem Bodensatz	milchig getrübt	weißlich verfärbt. Sehr starker Bodensatz
4, 5, 41, 42	Milchinstitut	.	„	dgl.	dgl.	dgl.
26, 50, 51, 52	Frauenmilch	Stamm 50 schwache Hämolyse	„	„	„	„
21, 31	Tonsillen	.	„	„	„	„
37	Eiter	.	„	„	„	„
28	Magensaft	.	„	„	„	„
18, 20, 23, 27	Urin	Stamm 18 schwache Hämolyse	„	„	„	„
17, 13, 26, 35, 36	Stuhl	.	„	„	„	„
53, 54, 55	Säuglingsstuhl	.	„	„	„	„

Insgesamt: 27 Stämme. Stichkultur in 1proz. Milchzuckeragar alle gewachsen bei 15° und 37°. Stamm 1, 13, 18, 20, 28 auch bei 57°.

Typ II. Blutagar: kleinere bis größere Kolonien, mit starker Vergrünung und Aufhellung. Kolonie an sich mehr oder minder weiß.
Chinablaugar: Typ IIa: kleine, spitze, tiefblaue, festhaftende Kolonien.
Typ IIb: kuppelförmige, tiefblaue, festhaftende Kolonien.

Milchzuckeragar dagegen ein kräftiges. Bei Zimmertemperatur, sowie bei 37° war ein deutliches Wachstum im Stichkanal sichtbar. Eine Reihe von Stämmen wuchs auch noch bei 56°. Angeregt durch die Angabe in der Arbeit Heims, prüften wir nachträglich auch das Wachstum auf Cantanis Blutglyzerin-Agar, meinen jedoch, daß es dieses Spezialnährbodens zur Unterscheidung der Kolonien nicht bedarf. Jedenfalls ist die Auffindung der Streptococcus lacticus-Kolonien auf gewöhnlichen Blutplatten nicht schwer. Die Nährbouillon zeigte nach 24 Std. eine feine Trübung mit geringem Bodensatz. Impft man in milchzuckerhaltige Bouillon, so ist man über den nach 24 Std. sichtbaren Bodensatz überrascht, der eine Höhe von 3 cm erreichen kann.

Die Ausstrichpräparate aus dem Bodensatz der Bouillonkulturen lassen nach einigen Tagen eine ausgesprochene Neigung zur Bildung immer längerer Ketten erkennen.

Es hatten sich also 3 kulturell scharf abgrenzbare Typen des Strept. lacticus ergeben, von deren Vorkommen in Frauenmilch, Säuglingsstuhl, dem Nasenrachenraum, Verdauungstraktus wir uns durch unsere weiteren Untersuchungen überzeugen konnten. Herkunft und kulturelles Verhalten der einzelnen Stämme ersieht man aus Tab. 1, S. 40.

Stamm	Herkunft	Typ.	Hämolyse	Bouillon 37°		Milchzuckerbouillon 37°	
				12 Std.	24 Std.	12 Std.	12 Std.
3	Milchzucker	II a	.	getrübt	getrübt mit mäßigem Bodensatz	milchig getrübt	Bouillon weißl. verfärbt, sehr starker Bodensatz
15	Milch	II b	.	„	dgl.	dgl.	dgl.
48, 49	Frauenmilch	II a, II b	.	„	„	„	„
6, 9, 11, 22, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64	Nasenrachenraum	alle II a bis auf 22, 59 II b	Stamm 9	„	„	„	„
12	Urin	II b	.	„	„	„	„
14	Peritonitisexsudat	II a	.	„	„	„	„
16	Duodenalsaft	II a	.	„	„	„	„
19	Galle	II b	Stamm 19	„	„	„	„
29	Ulcusboden	II a	.	„	„	„	„
38	Darm	II b	.	„	„	„	„

Insgesamt: 23 Stämme. Stamm 9 und 19 Hämolyse. Stich in 1proz. Milchzuckeragar alle bei 15° und 37° gewachsen. Stamm Nr. 3 und 11 auch bei 56°.

Typ III. Blutagar: große runde, tröpfchenartige Kolonien mit ausgesprochener Vergrünung und Aufhellung.

Chinablauagar: große runde, schleimige, tiefblaue Kolonien.

Auffallend ist bei Betrachtung der Tabellen das seltene Vorkommen des schleimig wachsenden Typ III; 2mal wurde er in Stuhl gefunden, 1mal in Sputum und Tonsillarabstrich und 1mal in Milchpulver. Bei der Literaturdurchsicht fanden wir eine Arbeit,

Stamm	Herkunft	Typ.	Vergrünung	Bouillon 37°		Milchzuckerbouillon 37°	
				12 Std.	24 Std.	12 Std.	24 Std.
2	Milchpulver	III.	Vergrünung	getrübt	getrübt mit mäßigem Bodensatz	milchig getrübt	weißlich verfärbt; sehr starker Bodensatz
47	Sputum	III.	„	„	dgl.	dgl.	dgl.
46	Tonsillen	III.	„	„	„	„	„
17, 30	Stuhl	III.	„	„	„	„	„

Insgesamt: 5 Stämme, alle bei 15° und 37° gewachsen. Stamm Nr. 2 auch bei 57°.

Pneumokokken: Blutagar: kleinere bis größere flache Kolonien mit Vergrünung. Chinablauagar: ganz kleine blaue Kolonien.

Stamm	Herkunft	Bouillon 37°		Milchzuckerbouillon 37°	
		12 Std.	24 Std.	12 Std.	24 Std.
7	Pleurapunktat	diffus getrübt	diffus getrübt	mäßig getrübt	mäßig getrübt ohne Bodensatz
8	Empyem	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
E 1894	Pleurapunktat	„	„	„	„
E 2055	„	„	„	„	„
E 2023	„	„	„	„	„
E 2173	Paukenhöhle	„	„	„	„
E 2295	Pleurapunktat	„	„	„	„
E 2429	Paukenhöhle	„	„	„	„
E 2686	Eiter	„	„	„	„
E 2594	Paukenhöhle	„	„	„	„

nach der wir geneigt sind, mindestens eine Verwandtschaft unseres Typ III mit dem von Violle 1921 in Paris gefundenen streptococque lactique glaireux anzunehmen. Violle (27) fand regelmäßig in der Milch der Märkte von Paris einen sich durch starke Schleimbildung auszeichnenden Milchsäure-Streptokokkus, der auf den üblichen Nährböden kümmerlich wuchs, dagegen gut auf solchen mit Zuckerzusatz. Er bildete aus allen untersuchten Zuckerarten Milchsäure und war für Menschen und Versuchstiere nicht pathogen. Sein Vorkommen in nitrathaltigem Ackerboden bzw. Stallboden, an den weißen Rüben usw. ließ Violle auf unreinliche Milchgewinnung schließen. Durch Immunitätsreaktionen, besonders spezifische Agglutination erwies er sich als verschieden vom gewöhnlichen Strept. lacticus und vom Strept. pyogenes, doch ist nach den Angaben der Autoren, die sich mit der Agglutination der Milchsäurestreptokokken beschäftigen (Jehle 10, Pincherle 17, Yamaguti 29), diese Methode kaum brauchbar, auf ihre Resultate hin Artunterschiede zu begründen.

Bei Typ I sahen wir nur bei 2 Stämmen (St. 50 aus Frauenmilch und 18 aus Urin) schwache Hämolyse. Puppel, der auf die Frage der Hämolysebildung näher eingeht, fand bei den meisten Autoren eine Uebereinstimmung dahin gehend, daß die Milchsäure-Streptokokken, wenn überhaupt, nur Spuren von Hämolyse zeigen, im Gegensatz zu

den meisten aus pathologischen Prozessen bei Menschen gewonnenen Streptokokken, die eine beträchtliche Hämolyse aufweisen können. Er selbst fand bei seinen Untersuchungen durch Anwendung verschiedener Blutarten, daß von 18 Stämmen, von denen 7 in der 1. Kultur auf Ziegenblutagar Hämolyse gezeigt hatten, 2 diese Fähigkeit schon in der 2. Kultur auch Ziegenblut gegenüber verloren. Von den restlichen 5 Stämmen, von denen auf Menschenblut nur 2 eine Spur von Hämolyse zeigten, wuchsen 3 auf Menschenblut anhämolytisch. Bei sämtlichen 5 Stämmen war die Hämolyse also auf Tierblut stärker ausgebildet als auf Menschenblut. Die stärkste Hämolyse war auf Ziegenblut eingetreten; dann nahm sie in der Reihenfolge Rind, Kaninchen, Mensch ab. Von 48 aus Marktmilch gezüchteten Stämmen waren 24 anhämolytisch, 15 zeigten eine Andeutung von Hämolyse, 9 wuchsen grün. Unter 18 „Mastitisstreptokokken" erwiesen sich alle bis auf einen, der starke Hämolyse zeigte, als anhämolytisch auf Menschenblut. Saito sah bei Strept. acidi lactici „zuweilen eine Hämolyse fehlen; wenn sie vorhanden war, war sie meist ausgebreitet, diffus, aber oft nicht vollständig". Er glaubt nicht, daß man Strept. pyogenes und acidi lactici mit voller Sicherheit durch die Beobachtung der Hämolyse trennen kann; dagegen sei der Unterschied von Strept. lanceolatus und Strept. acidi latici scharf.

Unter 38 aus Milch isolierten Stämmen bemerkte Ruediger (19) 8 mit beträchtlicher Hämolyse um die Kolonien, 14 mit schwacher, 9 mit grünen Zonen und einen Stamm, der nicht hämolytisch wuchs. Er rechnet die 8 hämolytischen zu dem Strept. pyogenes, die anderen zur Strept. lacticus-Gruppe. Jones (11a) konnte auf Pferdeblutagar von 72 Milchstämmen 56 hämolytisch wachsen sehen. Er fand, daß die nichthämolytischen in ihren Eigenschaften den Mastitisstreptokokken nahestehen. Die aus der Vagina, dem Speichel, von der Haut und aus den Fäces der Kühe isolierten Streptokokken waren sämtlich nicht hämolytisch. In einer späteren Arbeit (11b) gibt er von 25 Stämmen 10 als hämolytisch an, von denen 4 hämolytische „in verschiedenen Merkmalen" sich von echten Milchsäurestreptokokken unterschieden. Aus pasteurisierter Verkaufsmilch konnte Salter in Baltimore eine Anzahl hämolytischer Streptokokken auf Blutagar isolieren, die er dann mit solchen von Krankheitsfällen der Menschen (meist Empyem) verglich. Als ziemlich konstanter Unterschied ergab sich, daß den Milchstämmen die Fähigkeit, Saccharose zu vergären, fehlte. Auch waren sie apathogen für Mäuse. Die gleiche Eigenschaft der Saccharose-Nichtvergärung zeigten ebenfalls die 4 zuletzt genannten Stämme Jones'. Heim gibt von den 29 Stämmen, die durch Lackmußmilchprüfung als zur Strept. lacticus-Gruppe gehörig erkannt wurden, nur einen, aus Harn isolierten als hämolysierend auf Hammelblutagar an.

Aus alledem ergibt sich nun, daß die Frage des hämolytischen oder anhämolytischen Wachstums des Strept. lacticus wohl dahin zu beantworten wäre, daß man nicht mit absoluter Sicherheit von einem ausschließlichen nichthämolytischen Wachstum sprechen kann. Unsere Erfahrungen decken sich mit denen Heims: mit wenigen Ausnahmen wuchs der Strept. lacticus auf den üblichen Blutnährböden ohne Hämolyse.

Die Beobachtungen des vergrünenden Wachstums einzelner Streptokokkenarten auf Blut, welches wir besonders schön und stets bei den

Stämmen unseres Typ II und III beobachten konnten, haben in der letzten Zeit zu anregenden Arbeiten Veranlassung gegeben. Wir möchten gerne in Kürze auf die Frage der „Vergrünung" eingehen und die von uns hierbei gemachten Beobachtungen mitteilen. Schon Ruediger und Puppel erwähnen, daß bei einzelnen Lacticus-Stämmen ein vergrünendes Wachstum zu beobachten sei. Heim fand unter seinen untersuchten Stämmen nur einen, aus Zahnkaries, der mit ausschließlicher Vergrünung wuchs, mehrere, die Hämolyse und Vergrünung zeigten. Doch sind diese Stämme nicht lackmusmilchtypisch. Wir selbst fanden ebenfalls 2 Stämme, Nr. 19 aus Galle und 9 aus einem Tonsillarabstrich, die mit Hämolyse und Vergrünung wuchsen, doch waren beide lackmusmilchtypisch. Alle unsere anderen Stämme des Typ II, also 21, wozu noch 17 weitere aus Halsabstrich stammende, von uns aber weiter nicht geprüfte hinzuzunehmen sind, wuchsen ausnahmslos grün auf Ziegenblutagar. Typ III wuchs, wie oben beschrieben, ebenfalls mit Vergrünung, wie echte Pneumokokken. In diesem Zusammenhang sind nun die Arbeiten von Kuczynski und Wolff, Schnitzler und Pulvermacher, Valentine und Krumwiede (26) und die von Yamaguti zu erwähnen, die sich alle mit der Frage des vergrünenden Wachstums von Streptokokken beschäftigt haben.

Kuczynski und Wolff konnten beobachten, daß aus den Organausstrichen von mit hämolysierenden Streptokokken infizierten Mäusen, neben wieder hämolytischen solche mit nur schwacher Hofbildung, mit nur „schwacher Veränderung des Nährbodens" und solche mit deutlicher Vergrünung an Stelle der Bildung eines hämolytischen Hofes wuchsen. Bei weiteren Untersuchungen gelang es ihnen, aus einem hämolytischen Streptokokkusstamm im Tierversuch „Viridans"-Typen" zur Entstehung zu bringen, die sich „von grün wachsenden Kolonien aus Sepsis lenta-Fällen durch keinerlei Merkmale unterscheiden lassen". Schnitzler und Pulvermacher berichten, daß aus menschlichen Se- und Exkreten gezüchtete grüne Streptokokken bei Fortzüchtung auf Nährböden, teils auch im Versuch an der Maus hämolytisch wurden. Die frisch vom Menschen gezüchteten grünen Stämme verhalten sich nach ihren weiteren Erfahrungen bezüglich eines Ueberganges in den hämolytischen Zustand analog ihren experimentell vergrünten, aber zum Rückschlag bereiten Stämmen. Die Virulenz der Streptokokken im grünen Zustand war nach Angabe der genannten Autoren für Mäuse nur eine geringe; dagegen zeigten die zur Hämolyse umgeschlagenen Stämme eine dem grünen Ausgangskeim gegenüber erhöhte Virulenz. Die Verff. kommen auf Grund ihrer Beobachtungen zu dem Schluß, daß die grün wachsenden Streptokokken aus menschlichen Erkrankungen mit den experimentell erzeugten, in den avirulenten Zustand übergeführten Streptokokken grundsätzlich identisch sind. Valentine und Krumwiede beobachteten einen hämolytischen Strept., der auf Blut grüne Kolonien abspaltete. Bei Fortzüchtung behielten diese ihre Eigenschaft bei. Die Virulenz war geringer als die des hämolytischen Stammes, ließ sich jedoch durch Mäusepassage erheblich steigern. Das Hämolysierungsvermögen kehrte aber trotzdem nicht zurück. In seinen Untersuchungen über die in der Mundhöhle gefundenen „grünen Kokken" erwähnt Yamaguti die Schwierigkeit, aus der Fülle der auf einer Blutplatte grün wachsenden Kolonien einen saprophytischen grünen und einen parasitären Pneumokokkus zu unterscheiden, eine Auffassung, der wir uns nach unseren Erfahrungen voll und ganz an-

schließen können. Während Seitz durch Komplementbindung und Leuzinversuch zur Trennung der grünwachsenden Lanzettkokken des Mundes in H- und Z-Typen des Milchsäurestreptokokkus gelangt, nimmt Yamaguti eine Vielheit von Typen an. Für uns sehr bemerkenswert ist nun seine Beobachtung, daß die saprophytischen Keime — die wir auf Grund unserer Erfahrung zu der Strept. lacticus-Gruppe rechnen müssen — zwar eine Zeitlang in der künstlichen Kultur ihr Agglutinabilitätsvermögen unverändert beibehalten, dann aber plötzlich bei einer erneut vorgenommenen Prüfung mit den heterologen, früher positiv reagierenden Seren, mitunter aber auch mit dem homologen Serum negative Agglutinationsresultate gaben. Der Autor meint, der saprophytische Keim stehe in scharfem Gegensatz zum parasitären, der bei künstlicher Kultur auf den gewöhnlichen Nährböden sich jahrelang als absolut konstant bewies. In diesem Zusammenhang möchten wir eine Beobachtung von uns mitteilen, die in Parallele mit den von Kuczynski und Wolff mitgeteilten Beobachtungen geht. Unser aus Eiter aus der Paukenhöhle gezüchteter Pneumokokkenstamm E 2173 erwies sich durch den Tierversuch (Maus in 17 Std. tot) nach dem Verhalten in Lackmusmilch und dem Fehlen des für die Milchsäurestreptokokken typischen Bodensatzes in Milchzuckerbouillon, sodann hinsichtlich seines Kohlehydratspaltungsvermögens als ein echter Pneumococcus. Die aus Herzblut der eingegangenen Maus gezüchteten Pneumokokken wuchsen mit der Bildung eines hämolytischen Hofes um die einzelnen, stark vergrünenden Kolonien. Das Ausstrichpräparat (Tuschenausstrich mit nachträglicher Fuchsinfärbung) zeigte deutliche Diplolanzettkokken mit schöner ausgeprägter Kapselbildung. Eine nach 4tägigem Aufenthalt der Platte bei einer Temperatur von etwa 25° gemachte Neuaussaat auf Blut zeigte die Pneumokokken noch lebend, mit Kapselbildung, doch war die Hämolyse lange nicht so ausgesprochen wie vorher. Im Verlaufe von 14 Ueberimpfungen auf Blutagar gelang es, ihn zu ausschließlich grünem Wachstum und Aufgabe der Kapseln zu bringen. Dann starb er plötzlich ab. Leider konnten wir den noch unbedingt nötigen Nachweis einer wirklichen Variation durch Tierversuch deshalb nicht erbringen. Doch zeigte der aus der 12. Ueberimpfung stammende Lackmusmilchversuch (siehe unten) eine zögernde Gerinnung der geröteten Lackmusmilch, die nach zähflüssig-kleistrigem Vorstadium erst am 3. Tage vollständig war. In bezug auf Inulin war das Spaltungsvermögen das gleiche geblieben, dagegen zeigte die Mannitbouillon eine Säuerung von 4,5 (siehe Tab. III). Durch weitere Untersuchungen an anderen Pneumokokkenstämmen möchten wir obige Beobachtungen auf ihre Richtigkeit nachprüfen. Diese Beobachtungen und die Angaben der Literatur lassen es für möglich erscheinen, daß es keine festen Trennungslinien zwischen pathogenen hämolytischen Streptokokken des Menschen und den hämolytischen der Milch einerseits, den grünwachsenden Milchsäurestreptokokken und den Pneumokokken andererseits gibt, und daß die Pathogenität gegenüber der weißen Maus bei vielen Streptokokkenstämmen mit dem Hämolysierungsvermögen in einem gewissen Zusammenhang steht. Betont muß werden: Pathogenität für die weiße Maus. Es sind uns sicher anhämolytische Stämme bekannt, die für den Menschen hochpathogen, für die Maus ganz apathogen sind; z. B. der Streptoc. putridus Schottmüller. Juhl (12) hat auf Veranlassung Bitters dieses Verhalten erst neuerdings wieder geprüft und sich von der Richtigkeit der diesbezüg-

lichen Angaben Schottmüllers und anderer Autoren überzeugen können. Bitter u. Sprenger (2a und 2b) haben weiterhin zeigen können, daß es einen Streptoc. mucosus haemolyticus gibt, der im Gegensatz zum Streptoc. mucosus Schottmüller, der im wesentlichen nur eine starke Vergrünung der Blutagarplatte bewirkt, für die Maus vollständig apathogen ist. Dieser Streptoc. mucosus haemolyticus ist seit 1914 in 30 Fällen isoliert worden, und zwar 12mal aus Ohreiter, 4mal aus Pleurapunktat, 2mal aus Empyemeiter, 4mal aus Herzblut bei Sektionen, 6mal aus Eiter (Abszeß der Hüfte, Sehnenscheidenentzündung, Panaritien) und 2mal aus „Abstrichen". Er fand sich in dem unter 1—5 genannten Material in Reinkultur vor und muß als Erreger der vorliegenden pathologischen Prozesse angesprochen werden. Niemals gelang es aber, mit diesem Streptokokkus durch subkutane und intraperitoneale Injektion massiver Dosen Mäuse zu töten. Aus einige Stunden nach der Injektion getöteten Mäusen konnte der Streptokokkus in unveränderter Form wieder herausgezüchtet werden. Der Strept. mucosus Schottmüller tötete nach subkutaner Injektion die Maus mit derselben Sicherheit und in etwa der gleichen Zeit wie der Strept. lanceolatus. Ein deutliches Auftreten von Hämolysierungsvermögen konnte nach Wiedergewinnung der Stämme aus dem Herzblut der verendeten Mäuse nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen schränken zum wenigsten die Allgemeingültigkeit des von manchen Autoren angenommenen Parallellaufens von Hämolysierungsvermögen und Pathogenität für die weiße Maus seitens der Streptokokken ein. Nicht uninteressant ist es, an dieser Stelle auf eine weitere Beobachtung Bitters (Dtsch. med. Woch. 1922) hinzuweisen. Bitter konnte an einem großen Material feststellen, daß aus pathologischen Affektionen seröser Häute und der Lunge gezüchtete Streptokokken meistens sehr schleimig wuchsen, so daß sie nicht selten mit dem Strept. mucosus haemolyticus verwechselt wurden. Schickte man diese Stämme mittels subkutaner Impfung durch die Maus, so starb die Maus, wie nach der Injektion eines Strept. pyogenes. Die aus den Mäusen wieder gezüchteten Streptokokken zeigten meist schon sofort, manchmal auch erst nach fortgesetzter Tierpassage, ein Zurückschlagen zum gewöhnlichen Pyogenes-Typ: die Schleim- und Kapselbildung war verschwunden. Nach intraperitonealer Injektion blieb das Schleim- und Kapselbildungsvermögen durch mehrere Generationen unverändert, vorausgesetzt, daß man die Streptokokken nicht aus dem Herzblut und anderen Organen, sondern aus dem Peritoneum wiedergewann. Auch durch fortgesetzte Weiterzüchtung der Ausgangsstämme auf Blutagar und noch besser auf Milchzucker- oder Glyzerinagar kann man die Schleim- und Kapselbildung beseitigen. Bitter steht auf dem Standpunkt, daß die Fähigkeit, Kapseln bzw. Schleim zu bilden, die Streptokokken zur Ansiedlung in Organen und Geweben. die über besondere Abwehrkräfte verfügen, erst befähigt, und erwähnt in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß sämtliche Erreger genuiner Pneumonien Kapselbildner sind: Strept. lanceolatus, Bact. pneumoniae Friedländer und Strept. mucosus Schottmüller.

Was nun die Abtrennung der Milchsäurestreptokokken von den pathogenen Streptokokken anbetrifft, so kommt man, wie aus dem oben Gesagten hervorgeht, mit den Unterschieden, die sich hinsichtlich der Vergrünung bzw. Hämolyse auf der Blutagarplatte ergeben, allein nicht aus. Wohl kann man den Typ I auf der Blutagarplatte ohne weiteres

vom Strept. pyogenes, lanceolatus und pleomorphus unterscheiden, aber eine Abgrenzung des Typ II und III von Strept. lanceolatus, pleomorphus und mucosus gelingt nicht. Die gleichzeitig beimpfte Chinablauplatte ermöglicht in vielen Fällen allerdings diese Abtrennung: ohne weiteres beim Typ III, der im Gegensatz zum Strept. mucosus hier sehr üppig und stark schleimig wächst, und auch bei Zimmertemperatur nicht schlecht gedeiht. Diejenigen Milchsäurestreptokokken von Typ II, die auf Chinablauagar das oben beschriebene, charakteristische kuppelförmige Wachstum zeigen, sind ebenfalls als nicht pathogene Vertreter abzutrennen. Bei den übrigbleibenden (IIa), die auf Chinablauagar die kleinen spitzen Kolonien bilden, ist es aber auch für den Geübten, wie wir in Uebereinstimmung mit Yamaguti feststellen konnten, oft unmöglich zu sagen, ob es sich nicht um Strept. lanceolatus oder pleomorphus handelt. Da nun dieser Typ (IIa) sowohl unter den aus Milch als auch den aus Darm und aus der Mundhöhle isolierten Stämmen sehr häufig vertreten war, so mußte versucht werden, andere Methoden heranzuziehen. Wir haben daher unsere sämtlichen Stämme sowohl dem von Heim angegebenen Lackmusmilchversuch unterzogen, als auch ihre Fähigkeit, Kohlehydrate zu spalten, untersucht. Zunächst möchten wir auf eine Beobachtung aufmerksam machen, die uns sehr brauchbar zur Unterscheidung des Strept. lacticus vom Pneumococcus zu sein scheint. Beim Ueberimpfen von Strept. lacticus in 1proz. milchzuckerhaltige Nährbouillon fiel uns die nach 24stünd. Bebrütung bei 37° eingetretene diffuse, stark milchige Trübung auf, die nach 48 Std. einem etwa 2,5 cm hohen Bodensatz im Röhrchen Platz machte. Die darüber stehende Bouillon war entweder klar oder relativ nur wenig getrübt. Heim und Puppel erwähnen beide gelegentlich den dicken Bodensatz, haben ihm aber offenbar keine differentialdiagnostisch wichtige Bedeutung beigelegt. In gewöhnlicher Nährbouillon trat unter denselben Bedingungen nur leichte Trübung mit ganz geringem Bodensatz auf. Die von Heim gesehene „Stippchenbildung" bei schrägstehenden Röhrchen war auch bei einer Anzahl unserer Stämme sichtbar. Ein Ausstrichpräparat des Bodensatzes ließ erkennen, daß es sich im wesentlichen um abgestorbene und gut erhaltene Lanzettkokken mit gutem Kettenbildungsvermögen handelte. So sahen wir z. B. bei den aus dem Mund gezüchteten Stämmen 50—57 nach einer 6tägigen Bebrütung in dem Ausstrichpräparat Kettenbildung bis zu 28 Gliedern. Innerhalb der Ketten war die Diplolagerung gut zu sehen. Das Ausstrichpräparat von der Platte hatte nur Diplolanzettkokken gezeigt. Kapseln konnten wir mit der von uns angewandten Tusche-Fuchsinfärbung in keinem der untersuchten Fälle nachweisen, während die durch die Maus gegangenen Pneumokokken sowohl im Organ- wie im Kulturausstrich stets solche zeigten. Heinemann (8) sah ebenfalls beim Strept. lacticus, der einer Tierpassage unterworfen war, keine Kapselbildung: wohl trat eine Neigung zur Kettenbildung und zur Hämolyse von Menschen- und Tierblut ein. Die Neigung zur Kettenbildung in flüssigen Nährböden sah auch Yamaguti und betont, daß die Abänderung der Wuchsform stets von der Diploform zur Kettenbildung geht und nie umgekehrt. Yamaguti fand bei dem Vergleich der aus der Mundhöhle isolierten grünen Kokken, daß die in langen Ketten wachsenden krümeligen Bodensatz hervorrufen gegenüber den mit diffuser Trübung wachsenden Diplokokken.

Unsere Beobachtungen gehen nun dahin, daß die Neigung zur Bildung eines dicken Bodensatzes in Milchzuckerbouillon den apathogenen, insbesondere den Milchsäurestreptokokken, eigentümlich ist. Es mag hier betont werden, daß wir als pathogen bzw. echte Pneumokokken nur diejenigen bezeichnen, die nach intraperitonealer Einverleibung die Maus zu töten vermochten und aus dem Herzblut des verendeten Tieres wiedergewonnen werden konnten. Unsere Pneumokokken stammten, wie gesagt, aus Pleurapunktaten und Ohreiter. Unsere aus Rachenabstrichen und dem Darm isolierten Milchsäurestreptokokken sind sämtlich im Tierversuch als apathogen befunden worden. Wir glaubten davon absehen zu können, sämtlich aus der Milch isolierten Streptokokken Mäusen einzuspritzen und haben nur reichlich jeden 2. Stamm der Prüfung unterzogen. Während sämtliche von uns als apathogen befundenen Lanzettkokken schon nach 7 Std. (37°) das oben beschriebene Phänomen der milchigen Trübung, und nach 24 bis 48 Std. die Bildung des sehr voluminösen Niederschlages in der weißverfärbten Bouillon zeigten, ließen 10 sichere Pneumokokken diese Erscheinung nach 48stünd. Bebrütung vermissen. Die Milchzuckerbouillon behielt ihre ursprüngliche Farbe; die Trübung und der nachfolgende Bodensatz hielten sich in ganz bescheidenen Grenzen. Bei über 48 Std. alten Kulturen entwickelte sich gelegentlich ein stärkerer Bodensatz, der aber nicht die Größe des bei Milchsäurestreptokokken üblichen erreichte. Wir halten die Prüfung von vergrünenden Lanzettkokken, die aus menschlichen oder tierischen Se- oder Exkreten gezüchtet sind, in 1proz. Milchzuckerbouillon (24 Std. Bebrütung) für ein gutes Verfahren, um die Pneumokokken von Milchsäurestreptokokken abzutrennen. Neben dieser Prüfung kann die gleich zu beschreibende Untersuchung in Lackmusmilch, die von Heim wieder neuerdings warm empfohlen wurde, erfolgen.

Leider sind wir nur in der Lage, über das kulturelle Verhalten eines pathogenen Diplostrept. pleomorphus in Milchzuckerbouillon und Lackmusmilch berichten zu können. Wir haben in der ganzen Zeit, über welche sich unsere Untersuchungen erstreckten, nur zweimal einen solchen in Händen gehabt, einen von ihnen aber außer auf der Blutagar- und Chinablauplatte, wo er wie Typ IIa der Milchsäurestreptokokken wuchs, nur im Tierversuch geprüft. Der 2. aus Ohreiter stammende verfärbte die Milchzuckerbouillon in 24 Std. nicht, bildete nur einen mäßigen krümeligen Bodensatz und ließ die Lackmusmilch unverändert.

Eine leichte Art des Nachweises der Zugehörigkeit eines Strept. zur Lacticus-Gruppe ist die von Heim angegebene Prüfung in Lackmusmilch. Heim nimmt sterile, 7proz. Lackmustinkturmilch und sieht nach Beimpfung mit Strept. lacticus, daß die Milch durch Reduktase elfenbeinfarben wird, dann von einem oben sich bildenden roten Ring aus ganz oder teilweise nach unten fortschreitend sich rötet. Bei einzelnen Stämmen mit verminderter Säurebildung wird die Milch weiß bis auf einen oben restierenden blauen Ring, der sich später entweder auch rötet oder nach unten fortschreitend mit weiß und rötlich wechselt. Die Gerinnung ist bei diesen Stämmen verzögert oder kann in ganz seltenen Fällen auch fehlen. Pneumokokken lassen die Milch in seltenen Fällen blau, meistens röten sie sie im ganzen, ohne sie zur Gerinnung zu bringen. Nur vereinzelt tritt Gerinnung der

vollständig roten Milch auf. Gleichzeitig mit dem Auftreten des roten Ringes setzt nach Heims Beobachtungen bei Milchsäurestreptokokken die Gerinnung ein, und zwar bei den meisten Stämmen spätestens nach 24 Std., bei denen mit verminderter Gerinnungsfähigkeit etwas oder erheblich später; in ganz seltenen Fällen kann sie, wie gesagt, ausbleiben. In jedem Falle aber wird die Milch unten weiß. Wir benutzten zunächst bei den ersten 30 Stämmen außer Lackmusmilch und Lackmusmolke auch Chinablaumilch und Chinablaumolke (Milch mit 9 Tropfen einer gesättigten Chinablaulösung auf 500 g), die wir bei Zimmertemperatur und 37° beobachteten. Auf die ausführlichen Protokolle möchten wir hier nicht näher eingehen, sondern zusammenfassend berichten, daß sich die Lackmusmilch besser bewährte, sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei einer Temperatur von 37°. Wohl war auch stets bei Chinablaumilch die Säurebildung durch eine mehr oder minder intensive Blaufärbung zu sehen, doch war diese quantitativ schwer zu beeurteilen. Die so wichtige Entfärbung der Milch blieb aus. Eine Abgrenzung von Pneumokokken und Milchsäurestreptokokken ist wohl mittels Chinablaumilch nicht möglich. Aehnlich verhält es sich mit Chinablau- und Lackmusmolke. Man kann in diesen beiden Nährböden den Grad der Säurebildung unterscheiden, und zwar gut in der Chinablau-, viel schwerer in der Lackmusmolke. In der folgenden Tabelle haben wir das Verhalten unserer Stämme zur Lackmusmilch bei einer Bebrütung von 37° wiedergegeben. Die Beimpfung der Lackmusmilch erfolgte nach Heims Vorschlag, um konstante Mengen Impfmaterials zu verwenden, mit 2 Oesen einer 24stünd. Nährbouillon (Tabelle II).

Tabelle II.

Verhalten zur Lackmusmilch. 24 Std. 37°	Typ I	Typ II	Typ III	Pneumokokken
Lackmusmilch elfenbeinweiß. Oben roter Ring, der nach unten weiter fortschreitet. Gerinnung nach 24 Std.	Stamm: 1, 5, 20, 23, 27, 28, 31, 35, 36, 39, 40, 42, 51, 55	Stamm: 3, 9, 11, 14, 15, 16, 48, 49, 56, 59, 60, 62, 63	Stamm: 17, 46, 47	
Lackmusmilch weiß bis auf bläulichen Ring oben, der weiter fortschreitet, oder ins Rötliche übergeht. Gererinnung spät	Stamm: 4, 13, 18, 21, 37, 41, 50, 52, 53, 54	Stamm: 6, 12, 19, 22, 29, 38, 57, 58, 61	Stamm: 2, 30	
Lackmusmilch rot. Keine Gerinnung				7, 8, E 1894, E 2055, E 2023, E 2173, E 2295, E 2429, E 2594, E 2686.

Bei Zimmertemperatur war der Eintritt der Entfärbung meist um 24 Std. verzögert, während die Gerinnung recht lange auf sich warten ließ. Unsere Pneumokokkenstämme zeigten nach Beimpfung ein Flüssigbleiben der Milch mit völliger Rötung, nur ein früher von Bitter beobachteter Pneumococcus aus Pleurapunktat hat nach 48 Std. gewöhnliche Milch zur Gerinnung gebracht. Unser schon oben beschriebener Pneumococcusstamm E 2173 zeigte nach einer Mäuse- und nach-

folgender 14maliger Blutagarpassage zunehmendes Kleistrigwerden der ganzen zart rosa gefärbten Milch mit nachfolgender kompletter Gerinnung nach reichlich 48 Std., während er vorher die Milch wohl rötete, aber nicht zur Gerinnung brachte. Das Uebrigbleiben eines roten bzw. blauen Ringes auf der Milchsäurestreptokokkenmilch, die durch Reduktase im übrigen entfärbt war, muß man auf die Wirkung des Luftsauerstoffes an der Oberfläche der Milch beziehen. Zum Beweise der Annahme wurde eine Reihe von beimpften Lackmusmilchröhrchen mit ausgekochtem Paraffinum liquidum überschichtet mit dem Erfolg, daß entweder eine vollständige Entfärbung der Milch auftrat und blieb, oder nach einigen Tagen sich ein ganz schmaler farbiger Ring entwickelte. Seine Entstehung verdankt er wohl Spuren von Luft, die in dem Paraffin zurückgeblieben waren. Das schönste elfenbeinfarbene Weiß, mit anderen Worten, die meiste Reduktase fanden wir bei den Stämmen 1—5 (siehe Tab. III), also bei Stämmen, die mit einer Ausnahme aus Milchpulver oder Milch isoliert waren. Die einzige Ausnahme stammte aus einem Säuglingsstuhl. Demgegenüber haben nur zwei Milchstämme etwas verzögerten Umschlag in Weiß gezeigt. Die aus Se- und Exkreten des Menschen isolierten Stämme ließen ausnahmslos den Umschlag in Weiß erkennen, aber der Umschlag war nicht so in die Augen springend und trat auch etwas später auf. Sämtliche frühzeitig und intensiv entfärbenden Milchsäurestreptokokken gehören in die Gruppe I unserer Tabelle über das Zuckerspaltungsvermögen. Sie sind mit überwiegender Mehrzahl zum Typ I und nur je einer zum Typ II und III zu zählen. Hervorgehoben werden soll, daß Typ III, wie schon oben gesagt, trotz dieser prompten Entfärbung die Milch erst nach Tagen zur Gerinnung brachten. Die Lackmusmilch ist auch nach unserer Erfahrung ein brauchbarer Differenzialnährboden für diee Unterscheidung von Pneumokokken und Milchsäurestreptokokken. Wir möchten aber zur schnellen und einfacheren Diagnose auch die Milchzuckerbouillon warm empfehlen.

Um zu untersuchen, ob nicht auch in ihrer Fähigkeit, Kohlehydrate zu spalten, bei den einzelnen Typen des Streptococcus lacticus ein spezifisches Verhalten zu erkennen wäre und ob Pneumokokken sich anders verhalten wie Milchsäurestreptokokken, prüften wir alle Stämme auf ihr Säurebildungsvermögen aus folgenden Kohlehydraten und höheren Alkoholen: Dextrose, Laktose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Inulin, Mannit und Salizin, und zwar in 1proz. Nährbouillon.

10 ccm der obigen Zuckerlösungen bebrüteten wir nach Beimpfung (siehe oben) 6 Tage lang bei 37° und titrierten dann unter Verwendung von Phenolphtalein als Indikator. In jedem Falle wurden auch unbeimpfte Röhrchen, die sich die gleiche Zeit bei Brutschranktemperatur befunden hatten, zur Kontrolle titriert und der gefundene Säurewert von den in den unbeimpften Röhrchen erhobenen abgezogen. Um uns darüber zu orientieren, ob das Säurebildungsvermögen aus Dextrose, das ja allen hier in Frage stehenden Organismen in erheblichem Maße zukommt, bei 37° wesentlich höher ist als bei 15°, wurden Paralleltitrationen an 6 Tagen bei 15° gehaltenen Dextrosebouillonröhrchen, die mit den einzelnen Stämmen beimpft waren, vorgenommen. Es mag gleich hier gesagt werden, daß sehr große Unterschiede nicht gefunden wurden. Im allgemeinen sind die Zimmertemperaturwerte etwas niedriger, gelegentlich erheblich, gelegentlich aber auch höher

Tabelle III. Titrationstabelle.

Stamm Nr.	Dextrose 15°	Dextrose 37°	Laktose 37°	Saccharose 37°	Maltose 37°	Raffinose 37°	Inulin 37°	Mannit 37°	Salicin 37°	Typ.	Herkunft
Milchsäurestreptokokken											
1	5,2	6,1	5,5	0,5	5,5	0,9	1,3	3,6	5,7	I	Milchpulver
2	6,7	6,9	5,7	0,3	5,5	0,7	0,8	3,8	5,6	III	„
3	5,0	7,7	6,1	0,5	6,0	0,5	1,1	4,4	5,4	II a	„
4	5,7	7,9	4,7	0,6	6,1	1,0	0,5	4,2	5,9	I	Milchinstitut
5	5,5	4,9	3,5	0,7	4,0	0,7	0,7	4,5	5,6	I	
10	4,3	6,9	3,9	0,4	4,0	0,8	0,9	4,4	5,0	I	Milch „
39	5,2	6,2	5,9	0,8	5,7	0,6	1,3	4,5	5,5	I	Milchpulver
40	5,6	6,4	5,5	0,7	5,5	0,8	1,0	4,0	5,0	I	„
41	6,0	6,4	4,3	1,3	5,9	1,3	0,9	3,5	4,0	I	Milchinstitut
54	6,7	7,9	5,2	0,9	6,2	1,4	1,2	3,5	5,9	I	Säuglingsstuhl
13	5,6	7,9	5,0	7,0	6,5	0,7	0,6	3,1	5,9	I	Stuhl
17	6,7	7,3	6,0	7,2	6,2	0,6	0,6	4,3	5,7	III	„
18	5,7	7,7	6,1	7,4	5,5	0,7	0,9	4,5	5,6	I	Urin
20	5,4	7,2	4,9	6,7	6,0	0,6	0,7	4,8	5,2	I	„
21	5,3	6,6	3,9	6,9	6,2	0,5	0,7	4,2	6,2	I	Tonsillen
23	8,5	8,4	7,7	5,9	7,0	0,9	0,7	4,4	6,7	I	Urin
26	6,6	7,7	6,4	7,7	7,1	1,0	0,6	4,7	6,0	I	Milch
27	4,4	7,5	6,4	7,3	6,9	0,8	0,8	5,5	5,8	I	Urin
28	5,3	5,8	5,5	6,9	5,1	0,5	0,3	3,6	4,0	I	Magensaft
30	5,7	7,7	4,0	5,9	5,8	0,7	0,4	4,5	5,6	III	Stuhl
31	5,2	5,7	6,0	7,0	6,8	0,5	0,6	4,2	5,3	I	Tonsillen
37	6,2	6,8	6,0	5,9	5,2	1,0	1,3	5,0	6,0	I	Eiter
52	4,2	4,5	4,8	5,5	4,0	1,0	1,2	3,9	4,0	I	Frauenmilch
53	5,3	6,0	6,8	5,5	6,0	0,9	1,5	3,0	5,2	I	Stuhl
35	3,4	6,0	7,0	6,2	6,8	0,4	7,0	1,2	5,4	I	Stuhl
36	4,5	6,0	6,5	6,1	6,2	0,9	6,8	1,9	5,4	I	„
46	3,9	6,5	4,5	5,5	6,1	0,8	4,5	1,5	5,8	III	Tonsillarabstrich
47	4,9	5,8	4,4	5,4	5,4	1,2	3,5	1,5	5,4	III	Sputum
50	5,2	3,5	3,8	4,5	3,8	1,0	2,5	1,3	3,8	I	Frauenmilch
51	4,7	4,5	3,0	3,5	3,7	0,7	3,0	1,4	2,8	I	„
55	5,0	6,0	6,5	6,0	6,0	1,3	4,5	1,1	2,9	I	Säuglingsstuhl
6	5,3	6,1	5,4	6,1	5,9	0,6	0,9	0,4	5,4	II a	Nasenrachenraum
11	5,0	5,9	5,3	6,0	5,7	0,7	0,6	0,5	5,2	II a	„
14	5,9	7,7	5,6	6,8	6,8	0,3	0,6	0,2	6,0	II a	periton. Exsudat
15	6,7	6,5	5,6	6,9	6,7	0,5	0,7	0,2	5,9	II b	Milch
16	5,6	6,2	5,5	6,8	6,9	0,9	0,4	0,5	5,7	II a	Duodenalsaft
19	5,2	7,5	5,9	6,9	5,2	0,3	1,2	0,8	5,7	II b	Galle
29	5,5	5,7	5,8	6,1	5,4	0,5	0,8	0,3	4,8	II a	Ulcusboden
12	6,0	5,9	5,7	4,7	4,9	0,9	1,4	1,3	6,1	II b	Urin
38	4,2	4,8	4,0	4,8	4,3	1,0	1,2	1,5	5,2	II b	Darm
48	4,0	4,6	4,0	5,1	3,5	1,5	1,0	1 4	4,5	II a	Frauenmilch
49	4,1	4,5	4,0	4,5	4,3	1,3	1,5	0,9	3,5	II b	„
61	5,4	6,0	5,0	4,9	5,5	1,6	1,6	1,3	3,0	II a	Rachenabstrich
63	5,4	6,4	5,0	4,5	5,0	1,4	1,2	1,2	4,5	II a	„
9	5,3	6,9	5,4	6,2	4,8	1,7	0,9	0,5	5,2	II a	„
56	5,0	5,4	3,0	4,5	5,4	0,9	2,4	1,3	3,0	II b	Rachenabstrich
57	4,3	4,6	5,0	5,2	5,6	0,6	2,9	0,9	5,0	II a	„
58	5,5	6,0	4,5	5,4	4,0	0,3	2,4	0 3	4,9	II a	„
59	4,2	4,0	5,0	4,2	4,3	0,9	3,0	1,4	4,0	II a	„
60	4,0	4,5	4,4	5,2	5,0	1,2	3,1	1,2	4,5	II a	„
62	4,3	4,8	5,2	4,8	4,7	1,4	2,9	0,9	3,2	II a	„
64	5,3	5,7	4,6	4,9	5,2	1,0	2,6	0,7	4,5	II a	„
22	4,8	5,5	5,0	5,0	5,0	0,9	2,6	1,4	4,0	II b	„

Stamm Nr.	Dextrose 15°	Dextrose 37°	Laktose 37°	Saccharose 37°	Maltose 37°	Raffinose 37°	Inulin 37°	Mannit 37°	Salicin 37°	Typ.	Herkunft
					Pneumokokken						
2055	2,5	4,0	3,2	4,5	3,7	1,7	5,0	1,6	1,5		Pleurapunktat
2173 I	3,7	4,5	4,5	5,0	4,4	4 3	4,2	1.3	4,1		Paukenhöhle
2173 II	2,9	4,5	5,0	4,8	5,0	4,5	4,5	4,5	3,5		„
2295	4,0	5,5	5,2	5,0	4,6	2,0	4,0	1,8	1,2		Pleurapunktat

wie die bei 37° gefundenen. Wir haben auf frühzeitige Titrationen verzichtet, da in der Literatur wohl Uebereinstimmung darüber herrscht, daß nach etwa 6 Tagen das Maximum der Säurebildung erreicht wird. Nach kürzeren Bebrütungszeiten lassen sich quantitative Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen in dem Sinne feststellen, daß, obgleich nach 6 Tagen ein gleiches Maximum von Säuerung erreicht wird, nach 1 bzw. 2 und mehreren Tagen erhebliche Differenzen festgestellt werden konnten. Da es uns aber nur auf die Fähigkeit, die verschiedenen Zucker überhaupt erheblich zu spalten, ankam, glaubten wir, von diesen mühseligen Zwischentitrationen Abstand nehmen zu können.

Tabelle III (S. 51 u. 52) gibt die Titrationsergebnisse wieder.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die 3 Typen in zwei große Gruppen zerfallen, die zwar in sich wieder Unterabteilungen hinsichtlich der Aufspaltung einzelner Zuckerarten erkennen lassen, doch ist in der Zugehörigkeit zu den beiden großen Gruppen eine straffe Gliederung zu bemerken. Die von Typ I und III gebildete Gruppe setzt sich aus 3 Unterabteilungen zusammen. Die in der Tabelle unter Stamm 1—54 aufgeführten Stämme zeichnen sich durch die Unfähigkeit der Saccharose-, Raffinose- und Inulinspaltung aus. Nr. 13—53 spalteten nicht Raffinose und Inulin, während 35—55 in Raffinose und Mannit nicht säuerten. Alle Saccharose-, Raffinose- und Inulin nichtspaltenden Stämme sind bis auf Stamm 54 (aus Säuglingsstuhl) entweder aus Milchpulver oder aus Milch isoliert. Daß diese Stämme besonders viel Reduktase bildeten, ist oben schon erwähnt worden. Sämtliche Stämme dieser 1. Unterabteilung gehören, wie die der beiden anderen der großen Gruppe I zum Typ I und III. Eine Ausnahme macht nur Stamm Nr. 3, der zum Typ IIa gehört, aus Milchpulver isoliert und thermoresistent ist. Der Stamm 3 ist ein thermoresistenter. Er hat bei der Herstellung des Milchpulvers mindestens 10 Minuten einer Temperatur von 65° im Vakuum widerstanden. Unten soll auf die Thermoresistenz und Thermophilie derartiger Stämme näher eingegangen werden. Es ist der einzige Typ II, den wir als thermoresistenten und thermophilen Vertreter besessen haben. Es erscheint uns nicht unmöglich, daß durch diesen Umstand sein Herausfallen aus dem Rahmen der übrigen von uns geprüften Vertreter des Typ II bedingt ist. Die übrigen von uns isolierten und geprüften thermoresistenten Milchsäurestreptokokken gehören dem Typ I an. Bitter hat außer diesen noch zahlreiche thermoresistente Milchsäurestreptokokken aus Milchpulver isoliert, und auf Blut- und Chinablauagar und in Milch geprüft. Alle gehörten dem Typ I an.

Die gleiche Unfähigkeit, Saccharose, Raffinose und Inulin zu zerlegen, sah auch Jones bei einer großen Anzahl seiner Stämme. Auch Salter fand, daß aus Milch isolierten Streptokokken die Fähigkeit, Saccharose zu vergären, fehlte.

Aus Jones' Arbeit geht nun nach unserer Meinung, obwohl Angaben über kulturelle Eigenschaften seiner Stämme bis auf solche über Hämolyse vollkommen fehlen, hervor, daß er Stämme unseres Typ I untersucht hat. Die Ergebnisse, die er durch die Prüfung des Kohlehydratspaltungsvermögen fand, sind die gleichen, wie sie unsere Stämme des Typ I und III zeigten. Auch er vermag drei Unterabteilungen zu unterscheiden, nämlich solche, die Saccharose, Raffinose und Inulin nicht spalten, solche, die Raffinose und Inulin unverändert lassen und schließlich die, die aus Raffinose und Mannit keine Säure bilden.

Allen Angehörigen der großen Gruppe I, wie übrigens auch der Gruppe II, im Gegensatz zu den Pneumokokken, ist es eigentümlich, die Raffinosebouillon nicht zu säuern. Unterabteilung 1 läßt außerdem Saccharose und Inulinbouillon unverändert, Unterabteilung 2 Inulinbrühe, Unterabteilung 3 Mannitbrühe. Bis dahin zeigen, wie gesagt, unsere Resultate mit denen von Jones absolute Uebereinstimmung. Zu bemerken wäre noch, daß 2 Stämme von Edelsäurern (Nr. 4 u. 5), die wir vom Forschungsinstitut für Milchwirtschaft erhalten haben, in Gruppe I, Unterabteilung 1 gehören. Von den 19 von Jones bezüglich der Säurebildung geprüften Stämmen, die sämtlich aus Milch isoliert sind, gehören 12 in unsere Unterabteilung 1, 4 in Unterabteilung 2 und 3 in Unterabteilung 3. Unsere Angehörigen der Unterabteilung 1 stammen, wie schon gesagt, mit einer Ausnahme aus Kuhmilch. In Unterabteilung 2 findet sich nur einer aus Kuhmilch und einer aus Frauenmilch, in Unterabteilung 3 2 aus Frauenmilch. Unsere Stämme vom Typ 2, von denen je einer aus Kuhmilch und einer aus Frauenmilch stammen, vermögen die Raffinosebrühe ebenfalls nicht zu säuern. Ein Teil von ihnen, darunter die beiden Milchstämme, bilden außerdem aus Inulin und Mannit keine Säure. Eine 2. Unterabteilung, deren Vertreter sämtlich aus Halsabstrichen stammen, säuern die Inulinbouillon schwach, nicht aber die Mannitbrühe. Dem Vorgange Jones' folgend, haben wir bei allen unseren Beurteilungen der stattgehabten oder nicht stattgehabten Säurebildung, Säurewerte, die sich nicht auf 1,6 n/10 NaOH erhoben, als Null bezeichnet. Die wenigen diesbezüglich von uns geprüften Pneumokokken verhalten sich in einer Hinsicht prinzipiell anders. Sie können aus allen geprüften Zuckern Säure bilden. Ihr Verhalten gegen Mannit und Salizin scheint allerdings wechselnd und bei einzelnen Stämmen verschieden zu sein. Die Säurebildung aus Inulin fanden wir in Uebereinstimmung mit der Literatur gut. In dieser Hinsicht verhalten sie sich wie die Angehörigen der Unterabteilung 3 der Gruppe 1 (Stamm Nr. 35—55).

Wie verhalten sich nun die Milchsäurestreptokokken der beiden Gruppen und ihrer Unterabteilungen der Milch bezüglich der Gerinnungsgeschwindigkeit gegenüber? Dieser Gesichtspunkt ist für den Milchwirtschaftler außer dem der Bildung angenehmer Geschmacksstoffe der ausschlaggebende. Wie aus Tabelle II hervorgeht, verteilen sich die guten Säurebildner auf alle Gruppen und Unterabteilungen und finden sich ziemlich wahllos in ihnen neben schlechten. Bezüglich der Typen haben wir oben schon hervorgehoben, daß die 5 uns zur Verfügung stehenden Vertreter des Typus III alle schlechte Säurebildner sind. Die Angehörigen der Typen I u. II können sich ganz verschieden verhalten. Alles in allem kommen wir deshalb zu dem Schluß, daß die Differenzierung der Milchsäurestrepto-

kokken unter sich durch Bestimmung ihres Säurebildungsvermögens aus den einzelnen Kohlehydraten wenig Wert hat. Nur zu einer Abtrennung gegenüber den Pneumokokken kann dieses umständliche Verfahren unter Umständen mit herangezogen werden. Besseres leistet schon die Beobachtung des Typs insofern nämlich, als Angehörige des Typus III für den Milchwirtschaftler keinen Wert haben dürften. Aber auch die Typentrennung reicht für die Beurteilung der Güte der Milchsäurestreptokokken nicht aus, da wir bei Typ I u. II gute und schlechte Säurebildner finden, nur die Lackmusmilchprobe ist in diesem Falle geeignet, wichtige Aufschlüsse zu geben. Daß für die Abtrennung der Pneumokokken die Typenbeobachtung von großer Wichtigkeit ist, haben wir schon oben hervorgehoben. Nur der Typ IIa kann nach unserer Meinung zu Verwechslung mit dem Pneumococcus Veranlassung geben und muß gegebenenfalls in Milchzuckerbouillon, Lackmusmilch, in taurocholsaurem Natrium (Neufeld) und im Tierversuch weitergeprüft werden.

Im Vorhergehenden ist wiederholt von thermoresistenten Milchsäurestreptokokken die Rede gewesen. Diese thermoresistenten Vertreter sind von uns aus Milchpulver, das nach dem Krause-Verfahren hergestellt ist, isoliert worden. Dieses Verfahren besteht im wesentlichen darin, daß die Rohmilch in einem Vakuum von durchschnittlich 600 mm und bei einer Temperatur von durchschnittlich 65° im Verhältnis 4:1 eingedickt und dann im Trockenturm bei einer Temperatur von durchschnittlich 90° aus einer schnell rotierenden Düsenscheibe verspritzt und augenblicklich getrocknet wird. Kißkalt und Bitter haben in einem ausführlichen Experimentalgutachten den Nachweis zu erbringen vermocht, daß Coli-Bakterien, die eine Erwärmung von 53° im Reagensglase in dichter Aufschwemmung (etwa 8 Milliarden Keime im ccm) über 3 Std. widerstanden, durch den Eindickungsprozeß allein, falls die letzte einlaufende Rohmilch mindestens 10 Min. im Eindicker verweilt, mit Sicherheit abgetötet werden. Die Rohmilch wurde von beiden mit massiven Mengen der genannten Coli-Art infiziert, so daß auf 1 ccm dieser Milch $^1/_2$—$^1/_3$ Millionen lebensfähiger Keime entfielen. K. u. B. schließen aus dem Ausfall ihrer Versuche, daß in der Rohmilch etwa vorhandene Typhus- und Paratyphuskeime durch das Eindickungsverfahren, bei dem die letzte in den Vakuumapparat einlaufende Milch mindestens 10 Min. darin zu verweilen pflegt, mit Sicherheit abgetötet sind. Ueberrascht waren sie zunächst durch die relativ großen Mengen von Milchsäurestreptokokken, die sich in dem fertigen Milchpulver, das außer dem Eindickungsprozeß auch noch den Trocknungsprozeß durchlaufen, neben im allgemeinen spärlichen Heu- und Kartoffelbazillensporen fanden. Diese Milchsäurestreptokokken gehörten vorzugsweise dem Typ I, einzelne aber auch dem Typ II und einer dem Typ III an. Veranlaßt durch die Arbeit von Patzschke (16) haben wir einen Teil unserer Milchsäurestreptokokken, insbesondere solche aus Milchpulver isolierte thermoresistente, auch hinsichtlich des Temperaturoptimums für ihre Säurebildung geprüft. Patzschke hat ja auch bei seiner Arbeit über das Milchbiorisationsverfahren solche thermoresistente Stämme in Händen gehabt und gefunden, daß sie nicht nur thermoresistent, sondern, was ihre Säurebildung anbetrifft, thermophil sind. Seine thermoresistenten vermochten bei Keller- und Zimmertemperatur die Milch in 96 Std. nicht zur Gerinnung zu bringen und die Lackmusmolke

nicht zu röten. Bei 28° begann die Gerinnung erst nach 20 Std., bei 37° war sie nach 24 Std. beendet. Anfänge der Gerinnung zeigten sich bei 44° schon nach 10 Std. Das Verhalten in der Lackmusmolke war dementsprechend. Patzschke zieht den für den Milchwirtschaftler wichtigen Schluß aus diesem Verhalten, daß eine nur die thermoresistenten Milchsäurestreptokokken enthaltende Milch bei kühler Aufbewahrung sehr lange unverändert bleibt. Ueber unsere eigenen Versuche unterrichtet am besten Tabelle IV (S. 56 u. 57), die einen Auszug der Ergebnisse unserer ausgedehnten Versuchsreihe enthält. Wir finden in dieser Tabelle 28 Stämme in Milch, Chinablau- und Lackmusmolke und im Milchzuckeragarstich bei 15°, 35° und 56° geprüft.

Die Stämme 1, 2 u. 3 stammen aus dem Milchpulver: die Stämme waren also sicher thermoresistent. Die übrigen Stämme, die, wie die Tabelle zeigt, nur bei höheren Temperaturen innerhalb von 96 Std. die Milch zur Gerinnung brachten, sind hinsichtlich ihrer Thermoresistenz (65°) nicht geprüft worden. Es ergibt sich nun, daß von den 3 Milchpulverstämmen keiner die Milch bei 15° in 96 Std. zur Gerinnung bringt. Die Lackmusmilch wird allerdings nach 24 Std. typisch verfärbt: Reduktase ist also genug vorhanden, die Säurebildung aber ist sehr gering, denn in der Chinablau- und Lackmusmolke ist eine Verfärbung nicht mit Sicherheit wahrzunehmen. Das Wachstum als solches ist bei 15° innerhalb 24 Std. nicht schlecht, wie uns die Beobachtung der Agarstichkultur zeigt. Wir haben überhaupt unter unseren 28 Stämmen nur einen einzigen (Nr. 20 aus Urin), der bei Zimmertemperatur innerhalb 96 Std. im Agarstich kein deutlich wahrnehmbares Wachstum zeigt, dagegen bei 37° gut gedieh. Außer den drei genannten Milchpulverstämmen haben auch alle übrigen die Milch nach 96 Std. Aufenthalt bei 15° nicht zur Gerinnung bringen können. Das erscheint auffällig! Wohl ist es bekannt, daß das Temperaturoptimum der gewöhnlichen Milchsäurestreptokokken bei 28° zu suchen ist (Patzschke), aber daß bei 15° über 96 Std. vergehen, ehe die Milch gerinnt, ist, wie gesagt, auffällig. Patzschke sah bei einer Temperatur, die manchmal 20° überstieg, allerdings auch erst Gerinnung nach 30—34 Std. Bei Kellertemperatur war die Gerinnung nach 72 Std. aber schon beendet. Patzschke sagt nicht, ob er Vollmilch oder Magermilch verwendet hat. Wir haben unsere Versuche mit Magermilch angestellt und sind geneigt, die lange Verzögerung der Gerinnung auf die Verwendung dieses Nährbodens zurückzuführen. Ein diesbezüglicher kleiner Versuch hat uns nämlich gezeigt, daß die Stämme 1—6, von denen 1 u. 2 Edelsäurer sind, in sterile Magermilch und Vollmilch geimpft, die letztere bei 20° früher gerinnen lassen, wie erstere. Ein ähnliches Verhalten konnte bei ca 15° festgestellt werden, nur mit dem Unterschied, daß während einer Beobachtungszeit von 6 Tagen die aus Se- und Exkreten gezüchteten Stämme 3—6 die Magermilch überhaupt nicht zur Gerinnung brachten, wohl aber die Vollmilch.

Stamm	20° Gerinnung		15° Gerinnung	
	Vollmilch	Magermilch	Vollmilch	Magermilch
1	54 Std.	72 Std.	96 Std.	120 Std.
2	54 „	72 „	96 „	120 „
3	54 „	72 „	96 „	—
4	60 „	96 „	—	—
5	60 „	96 „	170 Std.	—
6	60 „	96 „	170 „	—

Tabelle IV.

1. Stamm Nr. 2. Herkunft 3. Typ.	15° 24–96st.	37° 24st.				37° 48st.				37° 96st.				56° 12st.				56° 24st.				56° 48st.			
	Lackmusmilch	Lackmusmilch	Chinablaumolke	Lackmusmolke	Milchzuckeragarstich	Lackmusmilch	Chinablaumolke	Lackmusmolke	Milchzuckeragarstich	Lackmusmilch	Chinablaumolke	Lackmusmolke	Milchzuckeragar	Lackmusmilch	Chinablaumolke	Lackmusmolke	Milchzuckeragarstich	Lackmusmilch	Chinablaumolke	Lackmusmolke	Milchzuckeragarstich	Lackmusmilch	Chinablaumolke	Lackmusmolke	Milchzuckeragarstich
1 Milchpulver I	g o v	v g	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	++ v g	+	+	·
2 Milchpulver III	g o v	v g	+	+	+	v g	+	+	+	v g	·	·	·	v g	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·
3 Milchpulver II a	g o v	v g	+	+	+	v g	+	+	+	·	·	·	·	v g	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·
4 Milch I	g o v	v g	+	+	+	v g	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	v g	+	+	+
5 Milch I	g o v	v g	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
6 Rachen II a	g o v	g o v	+	+	+	·	·	·	·	v g	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
9 Rachen II a	g o v	v g	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
10 Milch I	g o v	v g	+	+	+	v g	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	v g	+	+	+
11 Hals II a	g o v	v g	+	·	+	v g	+	+	+	·	·	·	·	v g	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·
12 Urin II b	g o v	v g	+	+	+	v g	+	+	+	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·

| | | |

Daß in durch Hitze sterilisierter Milch bei nachträglicher Beimpfung mit Reinkulturen die Gerinnung langsamer vor sich geht, wie in spontan infizierter oder beimpfter Rohmilch, ist eine bekannte Tatsache.

Eine deutliche Säurebildung ließen durchschnittlich schon nach 24 Std. bei 15° eine größere Anzahl von Stämmen erkennen, wie aus dem Verhalten in Chinablau- und Lackmusmolke hervorgeht. Außer den 3 Milchpulverstämmen haben nur 5 in der genannten Zeit die Säurebildung vermissen lassen. Auffällig erscheint hier wie bei den anderen Leistungen, daß die Stämme ihr nach 24 Std. beobachtetes Verhalten innerhalb von 96 Std. nicht wesentlich änderten.

Bei 37° brachten viele Stämme die Milch schon nach 24 Std. zur Gerinnung. Alle zeigten in den Molken deutliche Säurebildung und wachsen gut im Stichkanal der Agarröhrchen. Von den 3 thermoresistenten Milchstämmen ließ einer die Milch erst nach 96 Std. gerinnen. Außer ihm wurden noch 3 Stämme gefunden, von denen einer dem Typ I, einer dem Typ IIa und einer dem Typ III angehört, die das gleiche Verhalten zeigten. Diese 3 Stämme sind aus menschlichen Se- und Exkreten isoliert. Beide geprüften Stämme vom Typ III gehören zu denen, die auch bei 37° erst sehr spät gerinnen (siehe oben). Ueberhaupt scheinen Stämme, die auch bei 37° länger als 24 Std. gebrauchen, um ein Milchröhrchen zur vollen Gerinnung zu bringen, keine Seltenheit zu sein. Wir fanden 8, die das Phänomen erst nach 48 Std. zeigten. Sie verteilen sich auf die Typen I, IIa und IIb. Sie stammen sowohl aus Milch, als aus Se- und Exkreten des Menschen. Was nun die Thermophilie angeht, so ist zu bemerken, daß die 3 Milchpulverstämme sämtlich die Milch zur Gerinnung bringen und im Agarstich üppig wachsen. Stamm 2 und 3 schon nach 12, Stamm 1 erst nach 24—48 Std. Thermoresistent bzw. thermophil wurden außerdem befunden Stamm 11, 13, 18, 20 und 28. Sämtliche stammen aus Se- und Exkreten des Menschen. Alle übrigen geprüften Stämme wuchsen offenbar bei 56° nicht, wie das Verhalten im Agarstich deutlich demonstrierte. Zur Züchtung bei 56° wurden die Kulturröhrchen in eine feuchte Kammer gesetzt, um das Austrocknen zu verhindern.

Es ist schon oben hervorgehoben worden, daß alle von uns als Pneumokokken angesprochenen Stämme die weiße Maus nach intraperitonealer Einverleibung etwa einer Oese Kulturmasse von einer 24stünd. Blutagarschale innerhalb von 10—36 Std. töteten und daß aus dem Herzblut und den Organen dieser Tiere die einverleibten Mikroorganismen in Reinkultur wiedergewonnen wurden. Die meisten Pneumokokkenstämme haben wir wiederholt durch Tiere geschickt, um eine etwaige Virulenzsteigerung oder Abschwächung und ein Zurückgehen oder Stärkerwerden der Hämolyse zu beobachten. Ueber den im allgemeinen negativen Ausgang dieser Untersuchung soll in einer eigenen Veröffentlichung berichtet werden. Unsere als Milchsäurestreptokokken angesprochenen Stämme waren, soweit sie untersucht sind, für die weiße Maus apathogen. Wir haben von 52 Stämmen 34 diesbezüglich geprüft, darunter alle auf Blutagar grün wachsenden, also die vom Typus IIa u. IIb. Yamaguti hat hervorgehoben, daß es sehr schwer sei, die aus Halsabstrichen gewachsenen „grünen Kokken" mit Sicherheit ohne weiteres als Pneumokokken oder Milchsäurestreptokokken anzusprechen. Wir schließen uns seiner Ansicht,

wie schon gesagt, voll und ganz an und haben feststellen können, daß auf normalen und katarrhalisch affizierten Rachenschleimhäuten echte Pneumokokken nur verhältnismäßig selten gefunden zu werden scheinen. Wir verfügen über eine Serie von 25 Halsabstrichen, in der nicht ein Pneumokokkus, dagegen ausnahmslos massenhaft Milchsäurestreptokokken vom Typus IIa u. IIb zu finden waren. Die Halsabstriche stammten zum großen Teil von Säuglingen. Es waren aber auch solche von Erwachsenen dabei. Eine zweite Serienuntersuchung von 12 erwachsenen normalen Personen ergab wieder bei Vorhandensein von massenhaften grünwachsenden Milchsäurestreptokokken (IIa u. IIb) das völlige Fehlen von echten Pneumokokken. Zwei von diesen Personen hatten vor der Entnahme mehrere Wochen keine Milch oder Milchspeisen genossen, und waren zudem starke Raucher, was Yamagutis Feststellungen gegenüber zu betonen ist. Der genannte Autor sagt, daß bei starken Rauchern häufiger einmal mäusepathogene, auf der Blutagarplatte grünwachsende Lanzettkokken gefunden wurden. als bei anderen.

Auf die Typenfrage der Pneumokokken sind wir im Vorstehenden absichtlich nicht eingegangen. Wir halten die Agglutinationsmethode zur Entscheidung der Frage, ob ein echter Pneumokokkus oder ein grünwachsender Milchsäurestreptokokkus vorliegt, ohne gleichzeitige Heranziehung des Tierversuches bzw. die Prüfung in taurocholsaurem Natrium (Saito-Neufeld) nicht für ausreichend. Das letztgenannte Verfahren scheint sicher und einwandfrei zu arbeiten, erfordert aber eine gewisse Uebung und Geschicklichkeit. Ob die Auflösung in taurocholsaurem Natrium ein absolut sicheres Kriterium zur Abgrenzung der Milchsäurestreptokokken gegenüber den Pneumokokken ist, wagen wir noch nicht zu entscheiden. Weitere Untersuchungen sollen uns darüber Klarheit verschaffen. Bei der Serumprüfung ist zu bedenken, daß ein Milchsäurestreptokokkusstamm vom Typus IIa, der vielleicht von taurocholsaurem Natrium aufgelöst wird, und nicht im Tierversuch geprüft wurde, gelegentlich unter den Typ IV der Pneumokokken eingereiht werden kann, ferner, wie Bürgers und Herz (4) erst neuerdings festgestellt haben, manche echte Pneumokokkenstämme, die nach der ersten Züchtung agglutinatorisch negativ sind, nach längerer Züchtung aber spezifische Agglutination zeigen. Uns kam es darauf an, in einfacher Weise ohne Tierversuch festzustellen, ob aus Se- oder Exkreten stammende, auf der Blutagarplatte grün wachsende pneumokokkenartige Lanzettkokken echte Pneumokokken sind oder nicht. Heims Verdienst ist es, darauf hingewiesen zu haben, daß die Lackmusmilch eine solche einfache Unterscheidung gestattet. Wir glauben aber, diese Methode durch die noch schneller und nach unserer Meinung sicher arbeitende Einsaat in 1proz. Milchzuckerbouillon ergänzt zu haben. Dem Milchwirtschaftler dürfte die schnelle massenhafte Entwicklung von Milchsäurestreptokokken in der Milchzuckerbouillon für viele Zwecke nicht unwillkommen sein.

Zusammenfassung.

1. Nach ihrem Verhalten auf Blutagar und Chinablauagar kann man die Milchsäurestreptokokken in 3 bzw. 4 Typen einteilen (I, IIa, IIb, III). Nur der Typ IIa, der bei Menschen nicht selten in Se- und Exkreten gefunden wird, aber auch in Tier- und Frauenmilch

vorkommt, kann zu Verwechslungen mit Pneumokokken und dem Diplostreptococcus pleomorphus Veranlassung geben.

2. Die Abtrennung des Typus IIa von den genannten pathogenen Lanzettkokken gelingt kulturell leicht durch die Beobachtung des Verhaltens in Lackmusmilch, besonders aber in 1proz. Milchzuckerbouillon. In dem letztgenannten Nährsubstrat zeigen sämtliche Milchsäurestreptokokken schon nach 8stündigem, noch besser nach 24stündigem, Aufenthalt im Brutschrank eine außerordentlich starke Trübung, einen auffällig voluminösen Bodensatz und eine deutliche weißliche Verfärbung der Bouillon. Pneumokokken und Diplostreptokokken verfärben nicht, machen nur eine mäßige Trübung und einen ebensolchen Bodensatz.

3. Durch quantitative Untersuchung des Säurebildungsvermögens von 53 Stämmen Milchsäurestreptokokken der verschiedenen Typen aus einer Reihe von Kohlehydraten und mehrwertigen Alkoholen (Dextrose, Laktose, Saccharose, Maltose, Raffinose, Inulin, Mannit, Salizin), konnten zwei große Gruppen mit 3 bzw. 2 Unterabteilungen gefunden werden. In die erste Gruppe gehörten sämtliche Angehörigen des Typus I u. III, und 1 thermoresistenter Stamm vom Typus IIa. Der Typus II fällt sonst in die beiden Unterabteilungen der Gruppe II. Von den geprüften Zuckern ist die Raffinose der einzige, der von keinem Stamm angegriffen werden konnte. Die geprüften Pneumokokkenstämme bildeten aus Raffinose Säure in wechselnder Menge. Den übrigen Zuckern gegenüber war ihr Verhalten ungleichmäßig. Einen praktischen Wert zur Unterscheidung der Milchsäurestreptokokken untereinander und gegenüber den Pneumokokken können wir dieser komplizierten Methode nicht zusprechen.

4. Aus menschlichen Se- und Exkreten, insbesondere auch aus Rachenabstrichen von Säuglingen und Erwachsenen, die allerdings keine Pneumonie und keine Tuberkulose hatten, wurden auffällig oft und viele Milchsäurestreptokokken vom Typ IIa und IIb gefunden. Pneumokokken dagegen fehlten.

Literaturverzeichnis.

1) Avers, Johnson u. Mudge, Journ. Infect. Dis. Vol. 34. p. 29, 49. — 2) Bitter, Dtsch. med. Woch. 1922. S. 1298. — 2a) Sprenger, Untersuchungen über Streptococcus mucosus. [Inaug.-Diss.] Kiel 1922. — 3) Brown and Orcutt, Journ. Infect. Dis. Vol. 31. p. 49. — 4) Bürgers u. Herz, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. S. 42. — 5) Fish, Ettau, Burky, L., Journ. Infect. Dis. Vol. 30. p. 49. — 6) Grotenfeld, Fortschr. d. Med. 1889. S. 286. — 7) Heim, Ztschr. f. Hyg. Bd. 101. S. 40. — 8) Heinemann, Journ. Infect. Dis. Vol. 195. p. 221. — 9) Holmann, Journ. of Med. Res. Vol. 34. p. 377. — 10) Jehle, Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 65. S. 40. — 11) Jones, a) Studies from the Rockefeller Inst. Vol. 39. p. 629; b) Journ. Exper. Med. Vol. 39. S. 347. — 12) Juhl, Streptococcus putridus (Schottmüller) als Erreger eines Pleuraempyems. [Inaug.-Diss.] Kiel 1921. — 13) Kuczynski u. Wolff, Berl. klin. Woch. 1922. S. 777, 804. — 14) Neufeld, Dtsch. med. Woch. 1922. S. 51. — 15) Orla-Jensen, The lactis acid bacteria. Kopenhagen 1919. — 16) Patzschke, Ztschr. f. Hyg. Bd. 81. S. 228. — 17) Pincherle, Arch. f. Kinderheilk. Bd. 52. S. 324. — 18) Puppel, Ztschr. f. Hyg. Bd. 70. S. 448. — 19) Ruediger, Amer. Journ. Publ. Health. 1912. p. 107. — 20) Saito, Archiv f. Hyg. Bd. 75. S. 123.

— 21) Salter, Amer. Journ. Hyg. 1921. p. 154. — 22) Schnitzler u. Pulvermacher, Münchn. med. Wochenschr. Jahrg. 70. S. 866. — 23) Seitz, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 89. S. 135. — 24) Sperling, Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. Jg. 40. S. 129. — 25) Steck, Untersuchungen über die bakterielle Besiedelung normaler Kuheuter. Luzern 1921. — 26) Valentine u. Krumwiede, Journ. Exper. Med. Vol. 36. p. 157. — 27) Violle, Ann. Instit. Pasteur. 1921. p. 218. — 28) Weigmann, Pilzkunde der Milch. 2. Aufl. — 29) Yamaguti, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 90. S. 348.

Nachdruck verboten.

Das Kaltauszugverfahren bei der Milzbrandpräzipitation.

[Aus dem Staatlichen Veterinär-Untersuchungsamt zu Potsdam (Leiter: Veterinärrat Dr. R. Standfuß).]

Von Dr. **R. Standfuß**, Veterinärrat, und Dr. **Fr. Schnauder**, ehem. 1. Assistenten.

Gelegentlich der Untersuchung von milzbrandigen Häuten mittels der Ascoli-Probe haben Francke, Standfuß u. Schnauder (1) einen neuen Weg zur Bereitung der Auszüge angegeben, das Kaltauszugverfahren. Dasselbe lehnt sich an die von Uhlenhuth und seinen Mitarbeitern (2, 3, 4) ausgearbeitete und beim Pferdefleischnachweis gesetzlich vorgeschriebene Arbeitsweise an. Es besteht darin, daß etwa 1 g zerkleinerte Hautteilchen mit 4—5 ccm Karbolkochsalzlösung überschichtet und über Nacht im Eisschrank ausgelaugt werden. Nach kurzem Ausschleudern bei hoher Umdrehungszahl ist der Auszug ohne weitere Behandlung zum Ascoli verwendbar. Das Verfahren hat sich nach den bisherigen Beobachtungen bei der Untersuchung frischer, gesalzener und getrockneter Häute bewährt. Der Gedanke lag daher nahe, die Auslaugung in der Kälte auch an anderen Organen, aus denen herkömmlich die Auszüge zur Ascoli-Probe gewonnen werden, zu versuchen. Einen geeigneten Gegenstand zu solchen Untersuchungen bildeten die von beamteten Tierärzten zur amtlichen Nachprüfung auf Milzbrand an das Institut eingesandten Proben, von denen nach den Bestimmungen des Viehseuchengesetzes Teile 1 Jahr lang aufzubewahren sind. Es lagen noch die Proben aus den Jahren 1922 bis 1924 vor, und zwar Proben von:

	davon hatten sich bei der 1. Untersuchung als positiv erwiesen:
96 Rindern,	24 Rinder,
17 Pferden,	1 Pferd,
6 Schweinen,	4 Schweine,
3 Schafen,	2 Schafe,
2 Ziegen,	
Zusammen 124	31

Die Aufbewahrung der Proben geschah in der Regel in der Weise, daß möglichst etwa erbsen- bis bohnengroße Gewebsstücke (meist Milzpulpa) in Fließpapier so dick eingewickelt wurden, daß die äußerste Schicht nicht mehr durchfeuchtet wurde; Blut wurde in der gleichen Weise, von Fließpapier aufgesogen, verwahrt. Die Proben kamen in Papierbeutel und fielen so langsam der Eintrocknung anheim. Zur

Untersuchung wurde entweder etwas von der Unterlage abgekratzt, oder das durchtränkte Fließpapier wurde unmittelbar zur Auslaugung verwendet. In den Fällen B. 2, 3 und 4/22 war die Milzpulpa in festverschlossenem Röhrchen über zwei Jahre aufbewahrt worden und erwies sich bei der erneuten Untersuchung als stark faulig erweicht. Im Fall A. 205/22 waren die Lymphknoten eines Rindes seit dem 19. 5. 1922 (also 2 Jahre 5 Monate) in Alkohol aufbewahrt worden. In den Fällen A. 1106/23, A. 1130 I, II u. III/23 und A. 431/24 wurden teils Lymphknoten, teils Milz und Nieren von Schweinen untersucht, die an örtlichem bzw. allgemeinem Milzbrand erkrankt waren. In den Fällen B. 37/24 und B. 49/24 sind neben dem getrockneten Milzbrei bei der ersten Untersuchung auch frische Teile zum Kaltauszug verwendet.

Der Untersuchungsgang gestaltete sich so, daß genau abgewogene Mengen der zu untersuchenden Teile mit genau abgemessenen Mengen der zur Auslaugung dienenden Karbolkochsalzlösung (0,85proz. Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 0,5 Proz. Acid. Carbol. liquefact.) überschichtet, über Nacht im Eisschrank aufbewahrt und am nächsten Morgen etwa 10 Min. bei hoher Umdrehungszahl (3000 Umdrehungen in der Minute) ausgeschleudert wurden. Die überstehende, in jedem Falle klare Flüssigkeit wurde sodann ohne weiteres in Ascoli-Röhrchen auf das zuvor eingefüllte präzipitierende bzw. Normalserum aufgeschichtet.

Die Voruntersuchungen erstreckten sich zunächst darauf, das günstigste Verhältnis von auszulaugendem Gewebe und Auslaugungsflüssigkeit zu ermitteln.

In Fließpapier eingezogener Milzbrei des Falles A. 499/22 wurde in nachstehender Weise zum Versuch angesetzt und in der oben angegegebenen Weise mittels der Ascoli-Probe untersucht:

Milzpulpa g	Karbol-kochsalzlösung ccm	Ergebnis		
0,1	2,0	klar, goldgelb	++	Alle Ringe, scharf und deutlich, kommen alle innerhalb einer Minute
0,05	2,0	„ gelblich	++	
0,05	3,0	„ „	++	
0,05	4,0	„ hellgelb	++	
0,05	5,0	„ „	++	

Vergleichende Untersuchungen mit Normalserum sämtlich negativ.

Da die Ergebnisse in allen Fällen positiv ausfielen, wurde zur Durchführung der späteren Versuche eine Mittellage gewählt (0,05:3); außerdem wurde für alle in den früheren Nachprüfungen positiv ausgefallenen Proben eine besonders starke Verdünnung gewählt (0,02:10), um zu beobachten, wie die einzelnen Ergebnisse bei sehr starker Verdünnung ausfallen würden.

Um festzustellen, nach welcher Auslaugungszeit die Auszüge für den Ascoli antigenhaltig genug seien, wurden von 5 verschiedenen positiven Proben Verdünnungen von 0,05:3 und 0,02:10 angesetzt und nach 2- und 4stündigem Auslaugen im Eisschrank und nachfolgendem 10 Min. langem Ausschleudern untersucht. Die Ergebnisse waren:

Probe Nr.	Verdünnung	nach 2 Std.	nach 4 Std.
B. 37/24	0,05 : 3	+	+
	0,02 : 10	—	+
B. 38/24	0,05 : 3	+	+
	0.02 : 10	—	+
B. 39/24	0,05 : 3	+	+
	0,02 : 10	—	+
B. 25/23	0,05 : 3	+	+
	0,02 : 10	—	+
B. 27/23	0,05 : 3	+	+
	0,02 : 10	+	+

Vergleichende Untersuchungen mit Normalserum sämtlich negativ.

Während also nach 2stünd. Auslaugung nur die stärkeren Lösungen positiv, die schwächeren dagegen fast alle noch negativ waren, ergaben sich nach 4stünd. Stehen durchgängig positive Ergebnisse.

Die nachstehende Uebersicht veranschaulicht die Ergebnisse der 124 untersuchten Proben im Vergleich mit den mit anderen Untersuchungsarten ermittelten Befunden.

Der Kaltauszug erfaßte sämtliche positiven Fälle, führte niemals zu Nebenringen mit Normalserum und gab in allen Fällen klare Auszüge. Lediglich in den Fällen A. 1130/I/23 Ly, A. 1130 III/23 Ly und A. 431/24 Ly, in denen örtlicher Schweinemilzbrand vorlag, trat in den Verdünnungen 0,02:10 auch nach 20 Min. keine Ringbildung auf, während sie bei den Verdünnungen 0,05:3 deutlich in die Erscheinung trat. Eine andere beachtenswerte Beobachtung wurde bei dem Fall A. 1106/23 Ly gemacht. Die Verdünnung 0,02:10 wurde in einem Glase von 10 mm lichter Weite angesetzt; nach dem Auslaugen über Nacht wurde ohne vorheriges Zentrifugieren oder Schütteln vorsichtig die zum Ascoli erforderliche Flüssigkeitsmenge aus den obersten, mittleren und untersten Schichten entnommen und der Versuch nach Umschütteln und 10 Min. langem Ausschleudern bei 3000 Umdrehungen in der Minute wiederholt. Die Ergebnisse waren:

	Vor dem Schütteln	Nach dem Schütteln
Oben	— 20 Minuten	+ 2 Minuten scharf, deutlich
Mitte	+ 3 Minuten scharf, zart	+ 2 „ „ „
Unten	++ 1 Minute scharf, kräftig	+ 2 „ „ „

Die Diffusion des gelösten Antigens geht demzufolge nicht so schnell vor sich, daß es nicht bei Auslaugen in hoher Schicht und in engem Röhrchen ohne Schütteln und Zentrifugieren zu Fehlschlüssen kommen könnte. Auf ein gründliches Durchmischen aller Schichten der Auslaugungsflüssigkeit kann mithin nicht verzichtet werden.

Zusammenfassung.

Das Ergebnis der an teilweise länger als 2 Jahre aufbewahrten Teilen von 31 milzbrandkranken und 93 nichtmilzbrandkranken Tieren läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die Auslaugung in der Kälte, wie sie von Francke, Standfuß und Schnauder zur Untersuchung von Milzbrandhäuten angewendet worden ist, hat sich auch bei Untersuchungen von Milz, Blut

Uebersicht.

Fall	Tierart	Mikroskop. Prüfung	Kultur	Ascoli-Präzipitation			Bemerkungen
				Koch-	Chlorof.-	Kalt- auszug	
B. 2. 22	Ochse	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 Min.	Impfmaus nach 12 Tag. gesund
B. 3. 22	Pferd	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 4. 22	Kuh	—	.	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 5. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 6. 22	Ochse	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 7. 22	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 8. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 9. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 10. 22	„	Milzbrand-bazillen	Milzbrand-kolonien	+	.	0,02 : 10 + 5 Min., fein, scharf 0,05 : 3 ++ 2 „ kräftig „	
B. 11. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 Min.	
B. 12. 22	Färse	Milzbrand-schatten	—	+	.	0,02 : 10 ++ 2 Min. kräft. scharf 0,05 : 3 ++ sofort „ „	
B. 13. 22	Jungrind	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 Min.	
B. 14. 22	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	Impfkaninch. n. 2 Tag. gesund
B. 16. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 17. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 18. 22	Rind	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 19. 22	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 20. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 23. 22	„	Milzbrdschatten u. -bazill.	—	+	.	0,02 : 10 + 4 Min. fein, scharf 0,05 : 3 ++ sofort kräftig, „	
B. 24. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 Min.	
B. 25. 22	Ochse	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	Impfmeerschw. n. 7 Tg. gesund
B. 26. 22	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 27. 22	Schaf	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	Impfmaus nach 4 Tag. gesund
B. 29. 22	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 30. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 31. 22	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 32. 22	Eber	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 35. 22	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 36 22	Pferd	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 37. 22	Rind	Milzbrand-schatten	.	+	.	0,02 : 10 + 3 Min. fein, scharf 0,05 : 3 ++ 3 „ kräftig, „	
B. 38. 22	Bulle	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 + 3 „ fein, scharf 0,05 : 3 ++ sofort kräftig „	
B. 39. 22	Kuh	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 ++ „ „ „ 0,05 : 3 ++ „ „ „	
B. 40. 22	Fohlen	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 Min.	
B. 42. 22	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 43. 22	Pferd	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 44. 22	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 45. 22	Pferd	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 46. 22	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 1. 23	„	—	—	—		0,05 : 3 — 20 „	
B. 2. 23	Pferd	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 3. 23	„	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 + 2 Min. zart, scharf 0,05 : 3 ++ 2 „ kräftig „	
B. 4. 23	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 Min.	
B. 5. 23	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 6. 23	Rind	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 8. 23	„	—	.	—	.	0,05 : 3 — 20 „	
B. 10. 23	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	

Fall	Tierart	Mikroskop. Prüfung	Kultur	Ascoli-Präzipitation			Bemerkungen
				Koch-	Chlorof.-	Kaltauszug	
. 11. 23	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 Min.	
. 12. 23	Färse	—	—	—	.	0,05 : 3 — 20 „	
. 14. 23	Ochse	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 15. 23	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 16. 23	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 17. 23	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 18. 23	Pferd	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 20. 23	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 21. 23	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 22. 23	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 23. 23	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 25. 23	Jungrind	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 + 3 „ fein, scharf 0,05 : 3 ++ sofort kräftig „	
. 26. 23	Schaf	Milzbrand-schatten	.	+	.	0,02 : 10 + 3 Min. fein, scharf 0,05 : 3 ++ 1 „ kräftig, „	
. 27. 23	„	—	.	+	.	0,02 : 10 + 2 „ „ „ 0,05 : 3 ++ 2 „ „ „	
. 28. 23	Pferd	—	—	—	.	0,05 : 3 — 20 Min.	
. 30. 23	Ochse	—	—	—	.	0,05 : 3 — 20 „	
. 31. 23	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 32. 23	„	Milzbrdbazill. u. -Schatten	—	+	+	0,02 : 10 + 2 „ fein, scharf 0,05 : 3 ++ 2 „ kräftig, „	
. 33. 23	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 34. 23	Schwein	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 35. 23	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	Impfkaninch. n. 3 Tag. gesund
. 36. 23	„	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 + 2 „ fein, scharf 0,05 : 3 ++ 2 „ kräftig, „	
. 37. 23	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 38. 23	Ochse	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 40. 23	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 1. 24	„	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 ++ 1 „ deutl., scharf 0,05 : 3 ++ sofort kräftig, „	
. 2. 24	Pferd	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 Min.	
. 3. 24	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 4. 24	Rind	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 5. 24	Kuh	—	.	—	.	0,05 : 3 — 20 „	
. 6. 24	Pferd	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 7. 24	Kuh	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 ++ 2 „ deutl., scharf 0,05 : 3 ++ 2 „ „ „	
. 8. 24	Bulle	Milzbrand-bazillen	Milzbrd.-kolonien	+	+	0,02 : 10 + 2 „ „ „ 0,05 : 3 ++ 2 „ „ „	
. 9. 24	Kalb	—	—	—	.	0,05 : 3 — 20 „	
. 10. 24	Stute	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 12. 24	Kuh	—	.	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 13. 24	Ziege	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 15. 24	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 17. 24	„	—	—	—	.	0,05 : 3 — 20 „	
. 19. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 20. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 21. 24	Ochse	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 22. 24	Pferd	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 23. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 26. 24	Kuh	—	.	—	.	0,05 : 3 — 20 „	
. 27. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 28. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 33. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
. 34. 24	„	Milzbrand-bazillen	Milzbrd.-kolonien	+	.	0,02 : 10 ++ 2 „ kräft., scharf 0,05 : 3 ++ 1 „ „ „	

Fall	Tierart	Mikroskop. Prüfung	Kultur	Ascoli-Präzipitation			Bemerkungen
				Koch-	Chlorof.-	Kalt-	
						auszug	
B. 35. 24	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 Min.	
B. 37. 24	„	Milzbrdbaz. u. -Schatten	Milzbrd.-kolonien	+	+	0,02 : 10 + 3 „ kräft., scharf 0,05 : 3 ++ 2 „ „ „	Kaltauszug aus fr scher Milzpulpa-
B. 38. 24	„	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 + 3 „ fein, scharf 0,05 : 3 + 3 Min. kräft., wenig unscharf	
B. 39. 24	„	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 + 2 Min. kräft., scharf 0,05 : 3 ++ 2 „ „ „	
B. 40. 24	Rind	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 42. 24	Kuh	Milzbrdbaz. m. Sporen	.	+	.	0,02 : 10 + 2 „ „ „ 0,05 : 3 ++ sofort „ „	
B. 43. 24	Färse	Milzbrand-schatten	.	+	.	0,02 : 10 + 2 Min. „ „ 0,05 : 3 ++ sofort „ „	
B. 44. 24	Stier	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 + 2 Min „ „ 0,05 : 3 ++ sofort „ „	
B. 45. 24	Färse	—	.	+	.	0,02 : 10 + 3 Min. „ „ 0,05 : 3 ++ 1 „ „ „	
B. 46. 24	Rind	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 47. 24	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
B. 48. 24	Kalb	.	.	.	.	0,05 : 3 — 20 „	Para-Rauschbr
B. 49. 24	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	Kaltauszug aus fri sch. Milzpulpa -
B. 50. 24	Ochse	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	dgl. —
B. 51. 24	Kuh	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	dgl. —
B. 52. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	dgl. —
B. 53. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	dgl. —
B. 54. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	dgl. —
A. 205. 22	Rind	.	.	+	+	0,02 : 10 + 3 Min. fein, scharf	seit dem 19. 5. 22 i Alkohol aufbew
				0,05 : 3	0,05 : 3	0,05 : 3 ++ 2 „ kräftig, „	Lymphknoten!
A. 499. 22	„	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,05 : 3 ++ 1 „ deutl., „	
A. 532. 22	Kuh	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 ++ 4 „ „ „ 0 05 : 3 ++ 2 „ „ „	
A. 1106. 23 Ly.	Schwein	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 + 5 „ fein, scharf 0,05 : 3 ++ 2 „ kräft., „	Lymphknot.u Milz u. Niere
A. 1106. 23 Mi. u. Ni.	„	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 + 10 „ schwach 0,05 : 3 ++ 2 „ deutl., scharf	eines Schweines
A. 1130 I. 23 Ly.	„	Milzbrand-bazillen	Milzbrd.-kolonien	+	.	0,02 : 10 — 20 „ 0,05 : 3 ++ 3 „ kräft., „ 0,1 : 3 ++ 2 „ „ „	Lymphknot.u Milz u. Niere eines Schweines
A. 1130 I. 23 Mi. u. Ni.	„	—	—	—	.	0.02 : 10 — 20 „ 0,05 : 3 — 20 „ 0,01 : 3 — 20 „	örtl. Milzbrand
A. 1130 II. 23 Ly.	„	—	—	—	.	0,02 : 10 — 20 „ 0,05 : 3 — 20 „ 0,1 : 3 — 20 „	Lymphknot.u Milz u. Niere eines Schweines
A. 1130 II. 23 Mi. u. Ni.	„	—	—	—	.	0,02 : 10 — 20 „ 0,05 : 3 — 20 „ 0,1 : 3 — 20 „	
A. 1130 III. 23 Ly.	„	Milzbrand-bazillen	Milzbrd.-kolonien	+	.	0,02 : 10 — 20 „ 0,05 : 3 ++ 2 „ kräft., scharf 0,05 : 1,5 ++ 2 „ „ „	Lymphknot.u Milz u. Niere ein. Schwein
A. 1130 III. 23 Mi. u. Ni.	„	—	—	—	.	0,02 : 10 — 20 „ 0,05 : 3 — 20 „ 0,1 : 3 — 20 „	örtl. Milzbrand
A. 431. 24	„	Milzbrand-bazillen	.	+	.	0,02 : 10 — 20 „ 0,05 : 3 ++ 2 „ deutl., scharf 0.1 : 3 ++ 2 „ „ „	Lymphknoten
A. 849. 24	Rind	Milzbrand-bazillen	Milzbrd.-kolonien	+	+	0,02 : 10 + 3 „ „ „ 0,05 : 3 ++ 2 „ „ „	Kaltauszug aus fri sch em Milzbrei +
C. 74. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	
C. 79. 24	„	—	—	—	—	0,05 : 3 — 20 „	

und anderen Gewebsteilen als ein sicheres, billiges und einfaches Verfahren zum Nachweise des Milzbrandes bewährt; es führte in allen Fällen zu sicher arbeitenden und klaren Auszügen. Nach 4stünd. Auslaugung im Eisschrank waren auch in sehr schwachen Lösungen für den Ascoli genügende Antigenmengen enthalten, Nebenringe wurden auch bei stärkeren Lösungen nicht beobachtet. Als zweckmäßige Arbeitsweise empfiehlt sich ein Mischungsverhältnis von 0,05 g Organ mit 3,0 ccm Karbolkochsalzlösung als Auslaugungsmittel; das heißt: ein etwa reiskorngroßes Stück wird in einem etwa zu $^1/_3$ mit Karbolkochsalzlösung gefüllten A-Röhrchen mindestens 4 Std. im Eisschrank ausgelaugt, leicht geschüttelt und 10 Min. bei 3000 Umdrehungen in der Minute ausgeschleudert. Der klare Auszug ist ohne weiteres für die Ascoli-Probe verwendbar.

Quellenverzeichnis.

1) Francke, G., Standfuß, R., Schnauder, F., und Müssemeier, F., Untersuchungen über den Milzbrandnachweis an Häuten mittels der Präzipitation. Arch. f. w. u. pr. Tierheilk. Bd. 51. 1924. S. 530—551.) — 2) Uhlenhuth und Steffenhagen, in Kolle-Wassermann, Handb. d. pathogen. Mikroorganismen. Bd. 3. 1913. S. 257. — 3) Uhlenhuth u. Weidanz, Praktische Anleitung zum Eiweißdifferenzierungsverfahren. Jena 1909. — 4) Weidanz, Anwendung des biologischen Verfahrens zum Nachweise von Pferdefleisch. (Ztschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 18. 1907. S. 73.)

Nachdruck verboten.

Virulenz des Speichels des lyssakranken Menschen und Einfluss anderer Krankheiten auf den Verlauf der Tollwut[1]).

Von Dr. **Otto Herrmann,** Chef des Pasteur-Instituts in Poltawa.

Die Frage der Ansteckungsfähigkeit des Speichels wutkranker Menschen ist noch nicht aufgeklärt.

Wenn man die Mitteilung von Casper, Magendie u. Breschet, welche 1823, als noch die subdurale, intrazerebrale und intraokulare Art der Infektion unbekannt war, den Speichel eines wutkranken Menschen ansteckend gefunden haben, außer acht läßt, da die derzeitigen Untersuchungen, wie schon Pasteur bemerkte, nicht auf wissenschaftliche Basis gestützt sind, so bleibt nur der einzige positive Fall von Bertarelli, in welchem mit dem Speichel eines lyssakranken Knabens von 10 Kaninchen 7 mit Erfolg infiziert worden sind. Da außerdem derselbe Autor in seiner früheren gemeinschaftlichen Arbeit mit Volpino und auch Remlinger mit Speichel negative Resultate erhalten hatten, glaube ich, daß mein Fall nicht ganz ohne Interesse sein dürfte.

Sk., 48 Jahre alt, wurde am 30. 6. 1923 in das Odessaer Bakteriologische Institut gebracht, da bei ihm Aëro- und Hydrophobia ziemlich klar ausgedrückt

1) Nach einem Vortrage, gehalten auf dem VIII. Allrussischen Kongreß der Bakteriologen, Epidem. u. Sanitätsärzte, 20.—26. Mai 1924 in Leningrad (Petersburg).

war. Er wurde sofort ins 1. Odessaer Krankenhaus übergeführt, wo er am 4. 7. starb. Am 12. 11. 1921 war er von einem Hunde (C) in die Hand gebissen worden. (4 Wunden, davon 2 tiefe). Vom 17. 11. bis zum 9. 12. 1921 wurde er täglich intensiv gegen Lyssa geimpft.

Eine nachträgliche Verletzung hat der Kranke mir gegenüber verneint, im Krankenhaus dagegen gab er an, daß er im Februar 1923 und vor 1 Monate oberflächlich vom Hunde gebissen worden sei. Die Frau des Kranken behauptete dagegen, daß er nur im Jahre 1921 gebissen worden sei, wo er auch die Wutschutzimpfungen durchmachte.

Somit ist 1 Jahr und 7 Monate nach Beendigung der Kur verstrichen, bis die Krankheit ausbrach, da die widersprechenden Aussagen des Kranken, daß er 1923 gebissen sei, keinen Glauben verdienen. Er behauptete nämlich, daß er sich im Gefängnis und nicht im Krankenhaus befinde. Dr. J. A. Feldmann hat bei ihm Dementia tabica gefunden. WR. war positiv sowohl mit dem Blute, wie auch mit der Zerebrospinalflüssigkeit. Möglicherweise waren wegen Lues die Schutzimpfungen nicht imstande, genügende Immunität zu bilden, und das Wutvirus war im latenten Zustande 1 Jahr und 7 Monate, bis die 1923 ausgebrochene Dementia tabica auch auf die Wirkung des Lyssavirus ihren Einfluß ausübte.

Der Speichel wurde bei Sk. $1^1/_2$ Tage vor seinem Tode genommen, das Gehirn 10 Std. nach dem Tode[1]).

Im Ammonshorn fand ich Negrische Körperchen. Kan. 47, welches mit dem Gehirn des Sk. subdural am 5. 7. 1923 infiziert wurde, erkrankte nach 17 und starb nach 19 Tagen an Wut.

Kan. 42 (Gew. 1100 g) wurde am 2. 7. 1923 intramuskulär mit dem Speichel des Sk. (1—2 ccm mit 6—7 ccm phys. Kochsalzlösung verdünnt) infiziert. Es erkrankte am 10. 7. 23 und starb unter paralytischen Erscheinungen am 12. 7. 23, also 10 Tage nach der Infektion. Obwohl das Gehirn sehr hyperämiert war und die Verimpfungen des Gehirns und des Blutes aus dem Herzen steril ausfielen, nahm ich zuerst an, daß Kaninchen 42 nicht an Wut gestorben ist, sondern an rechtsseitiger, sehr ausgedehnter Pleuritis, um so mehr, da eine 8tägige Inkubationsdauer für eine intramuskuläre Infektion zu gering schien. Jedoch habe ich, um der Sache auf den Grund zu kommen, mit dem Gehirn des Kan. 42 am 12. 7. 23 subdural 2 Kaninchen 54 und 55 infiziert, davon Nr. 55 am 17. März 1924 starb (Todesursache unbekannt). Kan. 54 dagegen erkrankte am 10. 8. und starb an Wut am 11. 8. 23, also 30 Tage nach der Inkubation.

Mit dem Gehirn des Kan. 54 (entnommen aus dem Glyzerin) wurde am 18. 8. 23 sub duram das Kan. 81 (Gew. 580 g) infiziert. Es erkrankte nach 11 und starb an Wut nach 12 Tagen nach der Infektion (s. Tab.).

Infiziert				Wann erkrankt	Stad. morbi	Wann gestorben	Nach wieviel Tagen gest.	Todesursache
wer	womit	wie	wann					
Kan. 47	Gehirn des Menschen	subdural	5. 7. 23	22. 7. 23	2	24. 7. 23	19	Wut
„ 42	Speichel des Menschen	intramuskulär	2. 7. 23	10. 7. 23	2	12. 7. 23	10	Wut und Pleuritis
„ 55	Gehirn des Kan. 42	subdural	12. 7. 23	16. 3. 24	1	17. 3. 24	247	Unbek.
„ 54	„ „ „ 42	„	12. 7. 23	10. 8. 23	1	11. 8. 23	30	Wut
„ 81	„ „ „ 54 (aus dem Glyzerin)	„	18. 8. 23	29. 8. 23	1	30. 8. 23	12	„

Wir sehen somit, daß Kaninchen 42, welches mit dem Speichel eines lyssakranken Menschen infiziert wurde, dennoch an Wut starb. Die

1) Für das mir zur Verfügung gestellte Material spreche ich meinen Dank aus Frau Prof. Stanischewskaja und Herrn Prof. Tiesenhausen.

zufälligerweise sie begleitende Pleuritis hat das Kaninchen aber wahrscheinlich so weit abgeschwächt, daß es in verhältnismäßig kurzer Zeit nach der Infektion der Krankheit erlag. Die negativen Resultate Remlingers und Bertarellis u. Volpinos sind vielleicht darauf zurückzuführen, daß ersterer seine Versuchstiere nur 2 Mon., letztere nur 3 Mon. beobachteten.

Schlußfolgerungen.

1) Der Speichel lyssakranker Menschen, noch zu Lebzeiten derselben entnommen, ist wahrscheinlich stets virulent, nur muß man in jedem Falle mit frischem Material Versuchstiere infizieren, dann dieselben lange genug beobachten und weitere Verimpfungen veranlassen, falls irgendein Zweifel an der Todesursache entsteht. — 2) Begleitende Krankheiten scheinen ungünstig auf die Bildung der Immunität zu wirken, sogar auch dann, wenn nach der Infektion mit Lyssavirus längere Zeit intensiv geimpft wird. Folgen aber der Infektion mit Wutvirus keine Schutzimpfungen, so scheint die Inkubationsdauer durch die begleitende Krankheit sehr verkürzt zu sein.

Literatur.

Babes, V., Traité de la rage. 1912. p. 262 et 94. — Bertarelli u. Volpino, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1904. S. 223. — Bertarelli, E., Ibid. Orig. Bd. 39. 1905. S. 408. — Koch, J., Handbuch Kolle u. Wassermann. 1913. S. 832. — Marie, A., L'étude expérimentale de la rage. 1909. p. 44. — Remlinger, Soc. de Biol. 23. 1. 1907.

Nachdruck verboten.

Experimentelle und natürliche Lyssa recurrens.

Von Dr. **Otto Herrmann**,
Chef des Pasteur-Instituts in Poltawa.

1884 haben Pasteur, Chamberland und Roux einen Fall beschrieben, in welchem ein mit Wutvirus infiziertes Versuchstier nach 13 Tagen paralysiert wurde, sich dann aber erholte, nach 43 Tagen wieder erkrankte und nach einer 3tägigen Krankheitsdauer der Wut erlag.

Babes gibt an, daß nach der Infektion mit Straßenvirus oder abgeschwächtem Virus fixe bei Kaninchen am 5.—8. Tage fast immer etliche Stunden bis 2 Tage dauernde Temperatursteigungen (bis 40° C) zu beobachten sind, welche sich hin und wieder wiederholen und immer von einem Gewichtsverluste (vorwiegend am folgenden Tage) begleitet werden.

Diese als „fièvre prémonitoire" bezeichneten Temperatursteigerungen hat Babes auch bei vom Wolfe gebissenen Menschen beobachtet. Das prämonitorische Fieber kommt nach der Angabe von Babes nur bei sehr schwer Verletzten vor, welche dann meistenteils an Wut sterben.

Was die von Babes beschriebenen Temperatursteigungen bei Kaninchen anbelangt, so meint Högyes, daß eine Temperatur von 39,9 bis 40,0° C) nicht als Fieberanfall betrachtet werden kann, da eine solche Temperatur auch bei gesunden Kaninchen öfters vorkommt. Auch ich habe bei Kaninchen, welche aufs Geratewohl aus der Masse genommen wurden, öfter eine Temperatur von 40,0° C zu verzeichnen gehabt. Man muß daher wahrscheinlich bei Kaninchen die Temperatur von 40,0° C als Grenze zwischen der normalen und erhöhten Temperatur betrachten.

Periodische Wutanfälle haben aber auch v. Löte und Konradi beobachtet, und zwar waren diese mehr beweisend, als die von Babes beschriebenen, doch erschienen dieselben nicht am 5.—8. Tage, wie Babes angibt, sondern zu verschiedenen Zeiten und waren auch von verschiedener Dauer.

So hat v. Löte bei einem Huhne den 1. Wutanfall 43 Tage nach der Infektion und den 2. nach $1^1/_2$ Monaten beobachtet. Von beiden Anfällen erholte es sich sehr langsam; nach $1^1/_2$ Jahren war sein Gang noch unsicher. Ungefähr dieselben Erscheinungen hat v. Löte auch bei einem anderen Huhne beobachtet, bei einem Kaninchen dagegen hat er einen Fieberanfall beschrieben, der 9 Tage dauerte und eine Temperatur von 41° C aufwies. Löte hat diese periodischen Lyssaanfälle „Lyssa recurrens" genannt. Er behauptet, im Gegensatze zu Babes, daß die Lyssa recurrens nur durch Infektion mit Wutvirus von mittelstarker Virulenz hervorgerufen werden kann.

Bei Konradi hatte unter anderen ein Kaninchen 4 Fieberanfälle und starb nach 411 Tagen an Wut. Ein anderes Kaninchen hatte am 12.—13. Tage eine Temperatursteigerung, den 2. Anfall nach 34 Tagen und erlag der Wut 13 Monate nach der Inokulation.

Auch ich habe öfters periodische Wutanfälle bei Kaninchen und Meerschweinchen beobachtet. Da dieselben unter verschiedensten Umständen, zu verschiedenen Zeiten, von verschiedener Dauer und nach der Infektion mit Wutvirus von verschieden starker Virulenz erschienen, so glaube ich, daß die Beschreibung der prämonitorischen Fieberanfälle von Babes nicht ganz richtig sind.

Wegen Raummangel teile ich hier nur einige Beispiele mit, hoffe aber, daß auch diese genügen werden, um das oben Gesagte zu bestätigen.

So wurde Kan. 64 mit fixem Virus sub duram infiziert, nachdem es zuerst 30 Tage immunisiert worden war. Ein unbedeutendes Fieber zeigte sich bei demselben am 3. Tage (s. Tab. I).

Tabelle 1.

Kaninchen 64	An welchem Tage vor der Infektion?				An welchem Tage nach der Infektion?						
	4.	3.	2.	1.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Gewicht in g	1030	1060	1100	1070	1035	1045	1070	1050	1035	920	805
Temp.	39,3	39,6	39,6	39,8	40,0[1])	39,0	**40,1**	39,6	**41,2**	39,8	Tod

1) Temperatur gemessen 2 Std. nach der Trepanation.

Kan. 118 wurde mit sehr virulentem Straßenvirus subdural infiziert und erlag der Wut am 19. Tage. Der prämonitorische Fieberanfall trat am 10. Tage (40,1° C) auf, das terminale Fieber fing am 15. Tage an (40,6°).

Kan. 88 wurde im Gegenteil mit sehr schwachem Wutvirus (2. Passage) subdural infiziert. Nur am 11. und 14. Tage war die Temp. 40,0° C, sonst war das Min. 38,5; Max. 39,8° C. Nach längeren Gewichtsschwankungen fiel endlich das Gewicht von 1190 auf 620 g am 55. Tage.

Kan. 101 wurde zuerst 24 Tage immunisiert und dann nach 9 Tagen subdural mit sehr virulentem Straßenvirus infiziert (2 Kontrolltiere wurden von demselben Virus nach 15 und 18 Tagen getötet). Es wurden 6 prämonitorische Fieberanfälle und dann Terminalfieber beobachtet (Tab. II siehe S. 72 u. 73).

Die Temperatur wurde täglich bis zum 50. Tage gemessen. In den Zwischenzeiten war sie normal: Min. 38,7°; Max. 39,9° C. Ungeachtet der Temperatursteigerungen stieg das Gewicht bis zum 46. Tage und fiel erst später allmählich, war jedoch auch zuletzt noch bedeutend höher als vor der Inokulation.

Manchmal sind periodische Fieberanfälle nicht nur mit Gewichtsschwankungen, sondern auch mit paralytischen Erscheinungen verbunden.

Meerschw. 73, welches subkutan mit dem Gehirn eines an Wut gestorbenen Kaninchens infiziert wurde, hatte etliche Fieberanfälle, bedeutenden Gewichtsverlust und Paralyse, wonach es sich wieder erholte. Das Gewicht fiel allmählich vom 19. Tage an bis zum 34. Tage von 460 auf 255 g. Danach wurde das Gewicht wieder höher, betrug am 63. Tage wieder 460 g, am 194. Tage schon 650 g. Später wurde das Meerschweinchen nicht mehr gewogen. Paralytische Erscheinungen wurden vom 32. Tage an ungefähr 30 Tage beobachtet. Nach leichtem Stoße fiel das Meerschweinchen und konnte sich nicht mehr aufrichten. Es erholte sich danach, doch traten hin und wieder Fieberanfälle auf. Die Temp. wurde täglich bis zum 135. Tage gemessen. Bis zum 91. Tage und später während der Zwischenzeiten war die Temp. normal: Min. 38,2; Max. 39,0° C. Meerschw. 73 starb unerwartet nach 9 Mon. (während meiner Abwesenheit). Todesursache unbekannt. Fieberanfälle, Gewichtsverlust und Paralyse schienen nicht voneinander abzuhängen (Tab. III siehe S. 72 u. 73).

Periodische Wutanfälle können auch in völlige Genesung übergehen.

So hatte Meerschw. 122 während 30 Tagen 6 prämonitorische Fieberanfälle. Temp. wurde täglich nur bis zum 31. Tage gemessen. In den Intervallen Min. 38,4° C, Max. 38,9°C. Während der Anfälle stieg die Temp. bis auf 39,7°C. Vom 26. Tage bis zum 31. saß das Meerschw. zusammengekauert. Danach wurde es wieder wohl und munter. Das Gewicht stieg bis zum 38. Tage (von 500 auf 570 g) und fiel danach bis zum 72. Tage auf 450 g. Später stieg es wieder allmählich. Es ist schon 1 Jahr und 4 Monate nach der Infektion noch ganz gesund und wiegt 875 g.

Da, wie wir sehen, experimentelle Lyssa recurrens ganz entschieden existiert, und zwar nicht selten vorkommt, so hat man wohl auch keinen Grund, die Möglichkeit einer natürlichen Lyssa recurrens zu bestreiten.

Babes hat einen Fall veröffentlicht, wo ein Hund in der Aufregung ein Kind und etliche andere Personen gebissen hatte. Danach beruhigte er sich wieder und erkrankte erst nach 12 Tagen an Wut. Er lebte noch, als das gebissene Kind an Hydrophobia starb.

Zaccaria hat angegeben, daß ein Hund einen anderen 13 Tage vor Beginn der Wutsymptome gebissen hatte. Beide Hunde erlagen danach der Wut. Analoge Veröffentlichungen haben Konradi (11 Tage) und Pampoukis (8 Tage) gemacht.

Aus diesen Mitteilungen wurde geschlossen, daß der Speichel wutkranker Tiere schon ungefähr 13 Tage vor Beginn der ersten Symptome virulent sein kann. Da jedoch experimentell der Speichel nur höchstens 3—6 Tage vor Beginn der ersten Symptome ansteckend gefunden wurde (Roux, Nocard, Rabieaux, Nicolas), so könnte man wohl annehmen, daß man es in den von Babes, Zaccaria Konradi und Pampoukis beschriebenen Fällen einfach mit prämonitorischen Wutanfällen zu tun hatte.

Tabelle

Kaninch. 101	—	—	1. Anfall	—		2. Anfall	—	3. Anfall	—	4. Anfall	
An welch. Tage nach der Infektion?	1.	15.	16.	17.	18.	19	20.	28.	29.	31.	32.
Gewicht Temp.	1625 39,6 41,8[1])	1735 39,4	1760 40,2	1710 39,7	1730 39,4	1765 40,3	1750 39,6	1740 40,2	1660 39,7	1810 40,0	1820 40,3

1) Temp. 4 Std. nach der Trepanation gemessen.

Tabelle

Meerschweinchen 73	Anfall	—	Anfall	—		Anfall	—	Anfall	—	Anfall	
An welch. Tage nach der Infektion?	91.	92.	93.	94.	97.	98.	99.	101.	102.	103.	104.
Gewicht Temp.	510 39,1	510 38,7	520 39,2	525 38,9	560 38,7	555 39,3	550 38,8	545 39,4	565 38,8	565 39,1	565 39,1

Ganz zweifellos scheint es sich um natürliche Lyssa recurrens in meinen Fällen bei einem Kater und einem Hunde gehandelt zu haben:

1. Fall. N. Sch. wurde vom eigenen jungen Kater am 30. 12. 1922 gebissen und gekratzt. Nach ungefähr 3 Wochen war der Kater am Morgen außerordentlich aufgeregt, biß und kratzte alles, was ihm in den Weg kam, nahm kein Futter, verkroch sich in dunkle Ecken und machte Versuche zum Entlaufen. Abends beruhigte er sich wieder, fing wiederum zu essen an und war am andern Tage wieder munter. Am 9. 2. 1923 wiederholte sich der Anfall, der ebenfalls nur 1 Tag dauerte. Am 22. 2. trat wieder ein Anfall außerordentlicher Aufgeregtheit ein. Am anderen Tage wurde er von mir im Odessaer Bakteriologischen Institute zur Beobachtung in einen Käfig gesetzt; er war damals sehr niedergedrückt. Kaum wurde der Käfig geschlossen, so fing er an, Heu zu fressen. Eine frisch getötete Maus dagegen, welche in den Käfig geworfen wurde, rührte er nicht an, doch war sie am nächsten Morgen schon aufgefressen. Von der Zeit an war der Kater ganz normal; er saß $1^1/_2$ Monate im Käfig, und da keine weiteren Anfälle vorkamen, wurde er am 17. 4. wieder freigelassen. Etwas nervös und menschenscheu war er auch nachher, im allgemeinen aber ganz gesund, bis er eines Tages Anfang November 1923 unerwartet gänzlich verschwand. Man kann zwar nicht mit Sicherheit behaupten, daß es sich beim Kater um natürliche Lyssa recurrens gehandelt hat, doch bringen die periodischen Anfälle von Aufgeregtheit, der Umstand, daß der Kater während des Anfalles die Maus nicht anrührte, dagegen Heu fraß, daß er sich dann überall verkroch, entlaufen wollte und zuletzt ganz verschwand, uns unwillkürlich auf den Gedanken, daß es sich um Lyssa recurrens gehandelt hat. Interessant ist noch, daß die Besitzerin des Katers 2—3 Wochen vor dem 1. Anfall bei demselben in ihrem Zimmer eine Maus mit gesträubten Haaren gesehen hatte, welche sich schwankend weiter bewegte und dann langsam verschwand.

2. Fall. Ein Hund biß zu verschiedenen Zeiten ein Kalb und etliche Personen. Das Kalb biß er anfangs August 1924, als er noch ganz gesund aussah. Nach 2 Wochen, also ungefähr am 15. 8., verletzte er einen 17jährigen Burschen und seinen Vater stark. Auch da schien er ganz gesund zu sein. Am 23. 9., also 5 Wochen nachher, biß er, immer noch gesund aussehend, eine Frau, und wiederum nach 2 Wochen, nämlich am 7. 10., als er schon 5 Tage krank und angebunden war, noch einen Taubstummen. Nach 3 Tagen starb der Hund an Wut. Das Kalb wurde Ende Oktober toll, ungefähr 3 Monate, nachdem es gebissen worden

II.

—	5. Anfall		—		6. Anfall			—		Terminalfieber		
35.	36.	37.	38.	39.	44.	45.	46.	47.	48.	59.	60.	61.
1880 39,8	1830 40,4	1840 40,2	1950 —	1955 38,7	1880 40,6	1930 40,7	1935 40,2	1920 39,9	1940 39,5	1850 40,3	1770 37,6	Tod

III.

—		Anfall				—		Anfall					
105.	115.	116.	117.	118.	119.	120.	122.	123.	124.	125.	126.	127.	128.
555 38,8	585 38,6	590 39,1	585 39,0	585 39,0	555 39,1	565 38,7	570 38,6	605 39,0	615 39,6	610 39,4	600 —	625 39,0	610 29,2

war. Der Jüngling, welcher nur von diesem Hunde gebissen war und sich nicht behandeln ließ, starb an Hydrophobia am 10. 10. 1924, also ungefähr $2^1/_2$ Monate nach dem Bisse. Die verletzte Frau wurde schutzgeimpft, die anderen 2 gebissenen Personen dagegen kamen nicht in Behandlung; ihr weiteres Schicksal ist unbekannt.

Dieser Fall zeigt uns, daß der Speichel dieses Hundes ungefähr 70 und dann noch ungefähr 55 Tage vor seinem Tode virulent war und daß er noch 17 Tage und dann wiederum 3 Tage vor seinem Tode verschiedene Personen gebissen hat. Er muß also Lyssaanfälle gehabt haben.

Ich möchte noch einen 3. verdächtigen Fall erwähnen. Am 30. 11. 1922 wurde in das 1. Odessaer Krankenhaus eine Frau gebracht, welche am nächsten Tage an Hydrophobia starb. Sie war als Magd bei Leuten angestellt, deren Hund sie gebissen hatte. Bald nach dem Bisse verließ sie den Dienst (wann, unbekannt), und da der Hund, als er sie biß, gesund zu sein schien, so hat sie sich weiter nicht um ihn bekümmert. Nach 1 Monat starb sie an Wut.

Diesen Fall habe ich in meiner Arbeit: „Die Ansteckungsfähigkeit des Blutes bei Lyssa humana“ mitgeteilt. Daselbst ist auch ein Teil der hier beschriebenen Versuchstiere erwähnt. Die übrigen Versuchstiere sind in meiner Arbeit: „Immunisation gegen Tollwut mit verschiedenen Vaccinen“ angegeben.

Es verpflichten uns diese Fälle, sehr vorsichtig zu sein, wenn es sich um Verletzungen von anscheinend gesunden Tieren handelt, da immer mit der Möglichkeit der Lyssa recurrens zu rechnen ist. Wenn somit ein bis dahin gesundes und ruhiges Tier ungewöhnlich aufgeregt erscheint und dabei jemand verletzt, so ist es ratsam, den Gebissenen gegen Tollwut zu impfen, und zwar auch, wenn das Tier nach der üblichen Beobachtung von 14 Tagen am Leben bleibt.

Schlußfolgerungen.

Experimentelle Lyssa recurrens existiert zweifellos und kommt ziemlich oft vor. Sie kann durch Straßenvirus verschiedener Virulenz und durch fixes Virus hervorgerufen werden. Durch letzteres vielleicht nur dann, wenn dasselbe zuerst abgeschwächt oder das subdural infizierte Versuchstier vorher immunisiert wird.

Wutanfälle kommen zu verschiedenen Zeiten vor und sind von verschiedener Dauer.

Prämonitorische Fieberanfälle sind nicht immer von Gewichtsverlust und paralytischen Erscheinungen begleitet, im Gegenteil können Anfälle, welche sich durch Gewichtsverlust oder Paralyse auszeichnen, ohne besondere Temperatursteigerungen vorkommen. Alle diese Erscheinungen können parallel verlaufen, aber auch entgegengesetzt.

Es scheint nicht nur experimentelle, sondern auch natürliche Lyssa recurrens öfters vorzukommen, was man stets im Auge behalten muß, wenn zu entscheiden ist, ob von anscheinend gesunden Tieren Gebissene sich den Schutzimpfungen gegen Tollwut unterwerfen müssen, und zwar um so mehr, da der Speichel lyssakranker Hunde lange vor dem Auftreten der ersten Symptome (2 Monate in unserem Falle) sich als ansteckend erweisen kann.

Literatur.

Babes, V., Traité de la rage. 1912. — Herrmann, O., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 94. — Ders., Mikrobiologie. Moskau 1924 (russisch). — Konradi, D., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 47, 68, 73. — v. Löte, J., ebenda. Orig. Bd. 39. — Nicolas, J., Soc. de Biol. 1906. p. 625. — Pampoukis, Ann. de l'Inst. Past. 1900. — Roux et Nocard, Ann. de l'Inst. Past. 1890. p. 163.

Nachdruck verboten.

Die Steigerung der Antikörperbildung durch intravenöse Manganchlorür-Einspritzungen[1]).

[Aus dem Institut für experimentelle Therapie „Emil v. Behring", Marburg, Lahn (Direktor: Prof. Dr. H. Dold).]

Von Priv.-Doz. Dr. **Hans Schmidt.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Walbum und sein Mitarbeiter Mørch[2]) haben gezeigt, daß es durch intravenöse Einspritzungen von Metallsalzen, von denen besonders Berylliumchlorid und Manganchlorür wirksam waren, gelingt, die Bildung von Diphtherieantitoxinen beim Pferde und die von Coli-Agglutininen bei der Ziege erheblich zu steigern.

1) Nach einem Vortrag in der Sitzung des Marburger Aerztevereins vom 21. 1. 1925.

2) D. Walbum u. J. R. Mørch, Annal. Instit. Pasteur. T. 37. 1923. S. 396.

Walbum nimmt an, daß die Bildung von Antikörpern in den Zellen durch enzymatische Prozesse geschieht, und da erfahrungsgemäß solche durch Katalysatoren beschleunigt werden und andererseits sich gerade Metalle als gute Katalysatoren erweisen, so folgerte Walbum, daß durch Einspritzungen von Metallsalzen die zur Bildung von Antikörpern führenden enzymatischen Prozesse katalytisch gesteigert werden können.

Von den vielen daraufhin geprüften Metallsalzen erwiesen sich $MnCl_2$ und $BeCl_2$ als besonders wirksam, indem unter dem Einfluß dieser Salze das Diphtherieantitoxin in einem Ausmaß gesteigert werden konnte, das die Wirkung aller früher erprobten Mittel [1]) weit übertraf.

Das intravenös einverleibte $MnCl_2$ wird nach Walbum zum weitaus größten Teil in den Darm und in geringem Maße durch die Nieren ausgeschieden. Ein gewisser Teil wird jedoch in den Organen aufgestapelt, wobei aber das Stapelungsvermögen der einzelnen Organe sehr verschieden ist; das größte scheinen die Lungen zu besitzen. Bei einem Vergleich der gestapelten Manganmengen in den einzelnen Organen mit der jeweiligen Steigerung des Antikörpergehaltes im Serum gegen Diphtherie immunisierter Pferde hat sich jedoch herausgestellt, daß eine Gleichsinnigkeit nur bei der Leber vorliegt. Mit anderen Worten: Ein Pferd, das gut Antitoxin zu bilden vermag, kann auch relativ viel Mangan in der Leber aufstapeln.

Nun hat man bekanntlich Mangan regelmäßig, wenn auch in sehr geringen Spuren, in der Leber gefunden. Es liegt nun nahe, diese normal in Spuren vorhandenen Manganmengen mit der Antikörperbildung in den Reticulo-endothelzellen der Leber [2]) in Verbindung zu bringen, wo das Mangan als Katalysator die zur Bildung der Antikörper führenden enzymatischen Vorgänge beschleunigt.

In diesem Sinne hat sich Walbum den Zusammenhang zwischen Manganeinspritzung und Steigerung der Antikörperbildung vorgestellt. Solange wir jedoch nichts Bestimmtes über den Ort und die Art der Bildung der Antitoxine und der Antikörper im allgemeinen wissen, bleibt diese Vorstellung Walbums nur eine brauchbare Hypothese. Ergänzend müßte man noch annehmen, daß Beryllium das Mangan als Katalysator vertreten kann. Mit $BeCl_2$ sind sogar bessere Erfolge erzielt worden als mit $MnCl_2$. Darüber, ob auch Beryllium ein spurenweis vorhandener regelmäßiger Bestandteil der Leber ist, liegen meines Wissens keine Untersuchungen vor.

Diese Versuche, mit $MnCl_2$ und $BeCl_2$ die Antikörperbildung zu steigern, sind nun auch von anderer Seite aufgenommen worden. Die Tatsache war ja von größter Bedeutung für die Herstellung möglichst hochwertiger Diphtherieheilsera, nachdem Madsen [3]) letzthin wieder die Forderung erhob, bei Diphtherieerkrankung sehr viel mehr Antitoxineinheiten zu geben, als bisher üblich war, und dieser Forderung kann nur entsprochen werden, wenn durch Verwendung möglichst hochwertigen (1000fachen) Serums die einzuspritzende Serummenge ein gewisses Maß nicht zu überschreiten braucht.

---

1) Literaturangaben über frühere Versuche, mit anderen Mitteln die Antikörperbildung zu steigern, finden sich in der Arbeit von D. Walbum u. J. R. Mørch, loc. cit., und D. Walbum u. G. Schmidt, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 42. 1925. S. 32.

2) F. Neufeld und H. Meyer, Ztschr. f. Hyg. Bd. 103. 1924. S. 595.

3) Th. Madsen, Ztschr. f. Hyg. Bd. 103. 1924. S. 447.

Auch bei anderen Antikörpern war es wünschenswert, ein Mittel zu besitzen, die Ausbeute erheblich zu vermehren. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß das, was bei den Antitoxinen des Diphtheriegiftes möglich ist, für andere Antikörper nicht in gleichem Maße zutrifft.

So hat Pico [1]) aus dem Hygienischen Institut in Buenos-Aires berichtet, daß er Walbums Ergebnisse zwar für Diphtherieantitoxine bestätigen konnte. Aber es gelang ihm nicht, durch $MnCl_2$-Einspritzungen bei der Herstellung von Tetanusheilserum und Schlangengiftheilserum (Lachesis alternans) eine Steigerung der Antikörper zu erzielen. Bei der Gewinnung von Antimeningokokkenserum konnte er durch $MnCl_2$-Einspritzung zwar die komplementbindenden Antikörper, nicht aber die Agglutinine steigern. Desgleichen verliefen seine Versuche, Präzipitine und Hämolysine bei Kaninchen durch $MnCl_2$-Verabreichung zu steigern, negativ.

Unsere eigenen Versuche sind nur mit $MnCl_2$ gemacht worden und führten dazu, die von Walbum gemachten Angaben im Großen und Ganzen zu bestätigen und zu erweitern.

Bevor wir auf unsere am Tier gewonnenen Erfahrungen eingehen, sei einiges zur Frage der Dosierung bemerkt. Walbum hatte von allen versuchten Metallsalzen das Cadmiumchlorid als das giftigste gefunden und nahm für $MnCl_2$ diejenige Dosis pro Kilogramm Körpergewicht, die selbst bei $CdCl_2$ noch ohne erkennbare Symptome von Vergiftung vertragen wurde. Diese Dosis betrug 0,001 ccm einer normalen $MnCl_2$-Lösung pro Kilogramm Körpergewicht bei Kaninchen. Ein 500 Kilogramm schweres Pferd vertrug das 10fache dieser Dosis, also 10 ccm einer $n/_2$ $MnCl_2$-Lösung. Diese Menge haben wir in keinem Falle überschritten und daher auch in keinem Falle Vergiftungserscheinungen bemerkt, die sich bei Ueberdosierung als Zittern, Schweißausbrüche und Fieber bemerkbar machen sollen. Das $MnCl_2$ ist, wie alle Schwermetallsalze, stark gewebsreizend. Es muß daher streng intravenös gegeben werden. Gelangt etwas von der Lösung in das Gewebe, so kommt es nach Walbum zu lang andauernden Infiltrationen. In die Arterie eingespritzt, soll $MnCl_2$ ein Pferd sehr schnell töten.

Walbum hat Pferde während der Diphtherieimmunisierung für längere Zeiten täglich mit $MnCl_2$-Lösungen intravenös behandelt, ohne Erscheinungen chronischer Vergiftung zu beobachten. Es ist jedoch für eine eventuelle Behandlung von Menschen mit Mangansalzlösungen wichtig zu wissen, daß eine typische Sprachstörung von Embden (Hamburg) als chronische Manganvergiftung beschrieben worden ist.

Was die Dosierung bei kleineren Tieren betrifft, so haben wir gefunden, daß Kaninchen, Meerschweinchen und Mäuse 1 ccm $n/_{10}$ $MnCl_2$-Lösung pro Kilogramm Körpergewicht gut vertragen.

Da aber aus Walbums Versuchen hervorgeht, daß bei 1 ccm $n/_{1000}$ $MnCl_2$-Lösung ein Optimum der Manganwirkung vorzuliegen scheint, haben wir bei kleineren Tieren stets 1 ccm $n/_{1000}$ $MnCl_2$ pro Kilogramm verwandt. Eine Verabreichung von $MnCl_2$ per os soll ohne jede Wirkung sein.

Wir haben nun zunächst die Wirkung des $MnCl_2$ auf die Antitoxinbildung bei Diphtherie und Tetanus erprobt und die guten Ergebnisse, die Walbum und Mørch bei der Diphtherieimmunisierung hatten, bestätigen und auch für Tetanusantitoxin feststellen können.

1) Pico, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 91. 1924. S. 1049.

Allerdings haben wir bald davon Abstand genommen, während der Immunisierungsperiode $MnCl_2$-Injektionen zu machen, da wir damit keine besseren Ergebnisse erzielten, als wir auch ohne Mangan erreichten, und wir überdies die Immunisierungszeit lange nicht so ausdehnen, wie es Walbum und Mørch angeben. Eine Immunisierung mit Diphtherietoxin nimmt bei uns etwa 6—8 Wochen in Anspruch und erzielt bei geeigneten Pferden ohne Manganverabreichung Titer von 500—1000 AE im ccm. Den großen Wert der Manganverabreichung erblicken wir vielmehr darin, daß sie bei der Blutentnahme den vorhandenen Titer noch zu erhöhen gestattet, gewissermaßen das Letzte aus dem Pferde herausholt. Man hat den Eindruck, als ob unter dem Einfluß des Mangans selbst der in den Zellen noch vorhandene Antikörper verfügbar gemacht wird. Die Erfahrung zeigte uns, daß Pferde, bei denen die Blutentnahme mit vorherigen Manganinjektionen gemacht waren, in der folgenden Ruhezeit einen geringeren Serumtiter aufweisen als Pferde, die kein Mangan erhalten hatten.

a) Diphtherieantitoxin.

Das 8jährige, ca. 500 kg schwere Diphtherie-Pferd Nr. 1205 hatte 16 Tage nach der letzten Blutentnahme, deren Serum etwa 350fach war, eine intravenöse Einspritzung von 10 ccm einer n/$_8$ $MnCl_2$-Lösung erhalten, und in kurzen Zeiträumen nach der Injektion wurden Blutproben entnommen und auf ihren Antitoxingehalt geprüft (Fig. 1).

Der Titer, der unmittelbar vor der Einspritzung auf 250 gesunken war, stieg im Verlauf einer Stunde auf 375 und blieb $^1/_2$ Std. lang auf dieser Höhe, um dann langsam im Verlauf einiger Stunden auf den ursprünglichen Wert vor der Einspritzung herabzusinken.

Dieses Maximum nach 1 Std. haben wir wiederholt feststellen können, und es entspricht auch den Feststellungen Walbums und Picos.

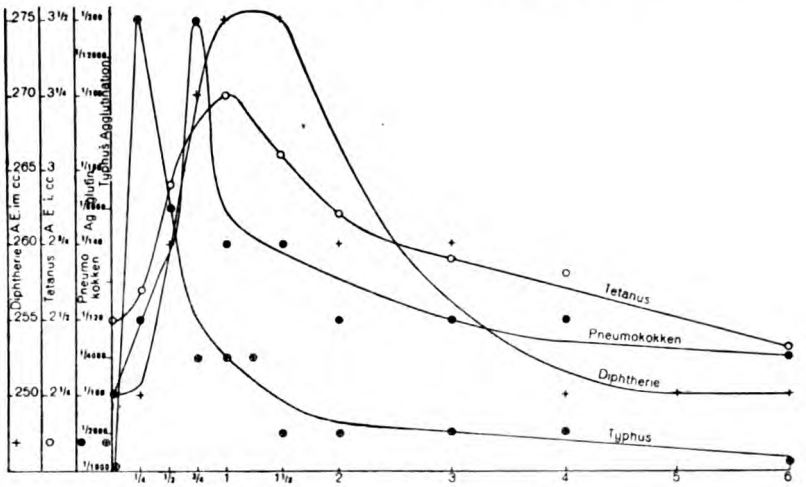


Fig. 1.

b) Tetanusantitoxin.

Bei gegen Tetanustoxin immunisierten Pferden ist der Verlauf ein ganz analoger, wie bei mit Diphtherietoxin behandelten Pferden.

Das 12jährige, 580 kg wiegende Tetanus-Pferd Nr. 1049 erhielt 12 Tage nach der letzten Blutentnahme, deren Serum 4fach war, eine intravenöse Einspritzung von 10 ccm einer n/2 $MnCl_2$-Lösung. Wiederholt in kurzen Zeitabständen vorgenommene Blutproben ergaben ein Ansteigen des Titers, der unmittelbar vor der Einspritzung $2^1/_2$ war und nach 1 Std. mit dem Titer $3^1/_4$ das Maximum aufwies, um dann schnell wieder abzusinken, so daß schon 6 Std. nach der Einspritzung der Titer niedriger war, als er zu Beginn war (Fig. 1).

Das spontane Abnehmen des Titers in so kurzer Zeit ist überüberraschend, da man doch erwarten sollte, daß die einmal aus den Zellen in die Blutbahn gebrachten Antitoxine sich mindestens längere Zeit darin erhalten könnten, wie das ja doch bei den durch Immunisierung ohne Mangan erhaltenen Antitoxinen zutrifft. Aus dem mittels Blutentnahme gewonnenen extravitalen Serum pflegen die durch $MnCl_2$-Wirkung vermehrten Antitoxine nicht zu verschwinden. Warum das beim lebenden Tier der Fall ist, bedarf noch der Aufklärung.

Bei Diphtherie- wie bei Tetanusantitoxin sehen wir also eine Titersteigerung, die 1 Std. nach der $MnCl_2$-Einspritzung ihr Maximum erreicht. In der Praxis wird man natürlich eine Manganeinspritzung nicht in der Ruhepause, sondern im Anschluß an die letzte Toxininjektion vornehmen und kann dann bei Diphtherieantitoxin die Zahl der Antitoxineinheiten oftmals über 100 pro 1 ccm steigern, während man bei Tetanusantitoxin mit einer Steigerung von $^1/_2$—1 Antitoxineinheit rechnen kann. Es ist das ungefähr das gleiche Verhältnis, wenn man berücksichtigt, daß die Antitoxineinheiten bei Diphtherie- und Tetanusheilserum in ganz verschiedenen Maßen angegeben werden.

Bei anderer antitoxischer Immunisierung, z. B. gegen Botulinustoxin und Shiga-Ruhrtoxin ist bis jetzt dieses Verfahren der Antitoxinsteigerung noch nicht angewendet worden, doch läßt sich vermuten, daß man auch da gute Ergebnisse wird erzielen können, wenn auch der negative Befund Picos bei Antischlangengiftserum dagegen zu sprechen scheint. Pico hatte ja auch bei Tetanusantitoxin keinen Erfolg, was wir nicht bestätigen konnten.

c) Antimeningokokkenserum.

Bei den bakteriotropen und bakteriziden Antisera, z. B. bei dem Antimeningokokkenserum, haben auch wir, wie Pico, 1 Std. nach der $MnCl_2$-Einspritzung eine deutliche Titersteigerung, mit dem Komplementbindungsverfahren gemessen, feststellen können, doch haben wir den Vorgang nicht genau zeitlich verfolgt.

d) Agglutinine.

Bei der Gewinnung von Agglutininen hatten Walbum und Mørch sehr gute Erfolge bei gegen Coli immunisierten Ziegen. Hier trat 4—6 Std. nach der $MnCl_2$-Einspritzung eine maximale Titersteigerung von $^1/_{50}$ (vor der Einspritzung) auf $^1/_{300}$ (nach der Einspritzung) ein. Wir haben Kaninchen benutzt, die wir mit Typhusbazillen und Pneumokokken vorbehandelt hatten. Die Fig. 1 zeigt die beträchtliche Titersteigerung, die nach einer $MnCl_2$-Einspritzung (1 ccm einer $n/_{1000}$ $MnCl_2$-Lösung pro Kilogramm) eintrat. Es ist aber bemerkenswert, daß in unseren Versuchen das Maximum sehr viel schneller eintrat, innerhalb der 1. Std., als das bei Walbums Versuchen der Fall war. Ferner hielt sich der Titer nur ganz kurze Zeit auf der Höhe, während bei Walbum das Maximum 2 Std. lang anhielt. Ob das daran liegt, daß wir mit Kaninchen, Walbum mit Ziegen arbeitete, bleibe dahingestellt.

Es ist bekannt, daß der Agglutinationstiter sehr leicht auf unspezifische Reize hin, wie es z. B. eine Einspritzung von physiologischer Kochsalzlösung ist, mit einer Erhöhung antwortet, aber meines Wissens ist die damit erreichte Titerhöhe nicht so groß, wie es in unseren Versuchen nach $MnCl_2$ der Fall war. Nur der Reiz größerer Blutentziehungen soll nach Versuchen, die allerdings nicht allgemein bestätigt werden konnten, eine noch höhere Titersteigerung bei Agglutininen veranlassen können.

Auf jeden Fall erregt die so auffallend schnell nach der intravenösen $MnCl_2$-Einspritzung einsetzende Titersteigerung den Verdacht einer unspezifischen Reizwirkung, so daß es nicht ausgeschlossen ist, daß die beobachtete Titersteigerung nichts mit einer katalytischen Wirkung des Mangans auf die enzymatischen Prozesse in den Leberzellen zu tun hat. Bei Walbums Versuchen kann man eher an eine spezifische Manganwirkung denken[1]).

Kaninchen mögen auch individuell sehr verschieden auf $MnCl_2$-Einspritzungen reagieren, wie sich das besonders bei der Hämolysinbildung unter Manganeinfluß gezeigt hat.

e) Hämolysine.

I. Mc Intosh und N. Kingsbury[2]) konnten bei Kaninchen, die gegen Schafblutkörperchen und gegen Typhus immunisiert waren, durch Injektion von Berylliumchlorid keine Erhöhung des hämolytischen oder bakteriolytischen Titers feststellen, ebensowenig gelang Pico eine Hämolysinsteigerung durch $MnCl_2$. Dagegen beobachteten Walbum und S. Schmidt[3]) mit Berylliumchlorid eine deutliche Steigerung der Hämolysinbildung bei Kaninchen. Allerdings hatten sie 10 bis 15 Proz. Versager bei ihren Kaninchen, d. h. Tiere, die auf die der Immunisierung folgenden Metallsalzeinspritzung überhaupt nicht reagierten. Das von Walbum und S. Schmidt beobachtete Maximum der Hämolysinbildung trat nach verschieden langer Zeit auf, je nach der Konzentration der verwendeten $BeCl_2$-Lösung. Bei $n/_{100}$-Lösung nach 2 Std. bei $n/_{1000}$-Lösung nach $1^1/_2$—2 Std. und bei $n/_{3000}$-Lösung nach $^1/_2$—$^3/_4$ Std. Noch schwächere und noch stärkere Lösungen hatten überhaupt keine Steigerung, sondern eine Abnahme zur Folge. Das Optimum der Steigerung war bei Verwendung einer $n/_{1000}$-Lösung also analog wie bei Mangansalzlösung.

Wir haben bei 3 mit Hammelerythrozyten vorbehandelten Kaninchen 1,0 ccm $n/_{1000}$ $MnCl_2$-Lösung intravenös angewandt und konnten, wie das folgende Protokoll eines unserer Versuche zeigt, keine deutliche Titersteigerung wahrnehmen.

1) Das Kaninchenserum war $^1/_2$ Std. lang auf 55° erhitzt worden. 0,5 ccm der Kaninchenserumverdünnung + 0,5 ccm $^1/_{10}$ verd. Meerschweinchenkomplement + 0,5 ccm 5proz. Hammelblutaufschwemmung. Gesamtvolum 1,5 ccm, Ablesung nach 2 Std. Brutschrankaufenthalt.

Es ist möglich, daß das von Walbum und S. Schmidt angewandte Berylliumsalz stärker wirkt als das Mangansalz, doch widerspricht dem das negative Ergebnis von Mc Intosh und Kingsbury. Man muß demnach annehmen, daß sich Kaninchen in dieser Hinsicht sehr verschieden verhalten, und der Prozentsatz der Versager eher höher ist als 15 Proz.

Soviel scheint aber aus den vorhandenen Beobachtungen hervorzugehen, daß der Metallsalzeinspritzung zur Steigerung von Agglutininen und Hämolysinen nicht die Bedeutung zukommt, die sie zweifellos für die Antitoxine hat.

1) Eine Beobachtung von G. Pacheco (Compt. Rend. Soc. Biol. T. 90. 1924. p. 298) ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, nach der eine Injektion von kolloidem Mangan die Normalagglutinine nicht beeinflußt, während nichtkolloides Mangan den Titer derselben erhöht.

2) Brit. Journ. of exper. Pathol. Vol. 5. 1924. p. 18.

3) Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 42. 1925. S. 32.

	Kaninchenserum in 0,5 ccm Volum					Kontrolle ohne Komplement
	0,0003	0,0002	0,00015	0,0001	0,000075	0,005
Vor der $MnCl_2$-Einspritzung	—	∓	±	+	+	+
Stunden nach der Einspritzung: ¼	—	∓	±	+	+	+
½	—	—	∓	+	+	+
¾	—	—	∓	±	+	+
1	—	∓	±	+	+	+
1½	—	∓	±	+	+	+
2	—	—	∓	+	+	+
4	—	∓	±	+	+	+
7	—	—	∓	±	+	+
24	—	—	±	+	+	+

+ keine Hämolyse, — völlige Hämolyse, ± mehr nicht-gelöste als gelöste Blutzellen, ∓ mehr gelöste als nicht-gelöste Blutzellen.

f) Komplement.

Wir haben dann noch eine Untersuchung vorgenommen, um den Einfluß einer $MnCl_2$-Einspritzung auf das Meerschweinchenkomplement festzustellen.

Wie das folgende Versuchsprotokoll zeigt, hat die intrakardial vorgenommene Einspritzung von $MnCl_2$ nicht nur keine Steigerung des Komplements bewirkt, sondern eine deutliche, ½ Std. nach der Einspritzung auftretende, allerdings schnell vorübergehende Abschwächung, die sich schon dadurch kenntlich machte, daß das nach ½ Std. entnommene Blut, im Unterschied zu den anderen Proben, keine spontane Gerinnung zeigte.

Meerschweinchen von 600 g bekam 0,5 ccm $n/_{100}$ $MnCl_2$ intrakardial eingespritzt. Zusatz von 1,0 ccm einer 2,5proz. Aufschwemmung 4fach sensibilisierter Hammelblutzellen. Gesamtvolum 1,5 ccm. Ablesung nach ½ Std. Aufenthalt im Wasserbad von 37°.

1 : 10 verd. Meerschweinchenserum	0,5	0,4	0,3	0,2	0,15	0,1
vor der $MnCl_2$-Einspritzung	—	—	—	—	∓	+
nach der $MnCl_2$-Einspritzung: ½ Stunde	—	—	∓	±	+	Blutprobe nicht geronnen
1 „	—	—	—	—	∓	+
2 Stunden	—	—	—	—	∓	+
4 „	—	—	—	—	±	+

Das Komplement ist eben kein Antikörper im Sinne des Diphtherieantitoxins, und es steht mit den theoretischen Anschauungen Walbums im besten Einklang, daß eine $MnCl_2$-Einspritzung auch keine Steigerung desselben bewirkte.

Die von uns beobachtete abschwächende Wirkung des $MnCl_2$ auf die Komplementfähigkeit des Meerschweinchenserums hat wahrscheinlich einen inneren Zusammenhang mit der von Pico gemachten Beobachtung, daß bei sensibilisierten Meerschweinchen in etwa 30 Proz. der Fälle, eine $MnCl_2$-Einspritzung das Tier vor den Folgen einer kurz darauf (1—4 Min.) gemachten Reinjektion völlig schützt[1]).

1) Auch die von A. Klopstock (Klin. Woch. 1925. Nr. 7. S. 313) beobachtete Schutzwirkung einer der Reinjektion vorausgegangenen $MnCl_2$-Einspritzung auf die Anaphylaxie möchte ich auf eine durch das Metallsalz bedingte kolloidchemische Aenderung des Plasmas zurückführen.

Zusammenfassung.

1. Die Beobachtung von Walbum und Mørch, daß eine intravenöse Einspritzung von $MnCl_2$ (1,0 $n/_{100}$—$n/_{1000}$ $MnCl_2$-Lösung pro Kilogramm Körpergewicht) den Diphtherieantitoxingehalt immunisierter Pferde beträchtlich steigert, konnte bestätigt werden. — 2. Die gleiche Wirkung der $MnCl_2$ konnte auch bei der Tetanusantitoxindarstellung beim Pferde beobachtet werden. — 3. Bei der Diphtherie- und bei der Tetanusimmunisierung tritt das Maximum der $MnCl_2$-Wirkung 1 Std. nach der Einspritzung auf und hält sich etwa $^1/_2$—1 Std. auf dieser Höhe. — 4. Bei der Immunisierung des Pferdes mit Meningokokken konnte durch $MnCl_2$-Verabreichung der Komplementbindungsfähigkeit des Serums gegenüber Meningokokkenextrakt gesteigert werden. — 5. Unter dem Einfluß von $MnCl_2$ trat bei Kaninchen, die mit Typhusbazillen oder Pneumokokken vorbehandelt waren, eine starke Steigerung des Agglutinationstiters auf. Diese erfolgt jedoch so schnell nach der Einspritzung von $MnCl_2$, daß eher an eine unspezifische Reizwirkung als an eine spezifische Manganwirkung auf den Agglutinin bildenden Prozeß in den Zellen zu denken ist. — 6. Auf die Hämolysinbildung bei Kaninchen hatte $MnCl_2$ keinen Einfluß. — 7. Die Fähigkeit des Meerschweinchenserums, als Komplement bei der Hämolyse zu wirken, erfährt durch eine vorhergegangene intrakardiale $MnCl_2$-Einspritzung eine vorübergehende Abschwächung. — 8. Das Verfahren, durch intravenöse Einspritzungen von $MnCl_2$-Lösungen, die Antikörperbildung zu steigern, empfiehlt sich vorderhand nur bei der Herstellung von antitoxischen Seren, weniger bei der Gewinnung anderer Antikörper.

Nachdruck verboten.

Zur Frage der Antikörperbildung in der Haut.

[Aus der Universitäts-Kinderklinik Leipzig (Direktor: Prof. Dr. Bessau).]

Von Dr. **Hans Fernbach,** Assistent der Klinik, und **Erich Hässler,** Med.-Prakt.

Köhler und Heilmann haben in Bd. 91, Heft 2 dieser Zeitschrift aus unserer Klinik über experimentelle Untersuchungen am Menschen berichtet, die durch den quantitativen Vergleich der sensibilisierenden Wirkung intrakutaner und intravenöser Serumgaben die Frage klären sollten, ob die Haut befähigt sei, in gleichem Maße wie die blutbildenden Organe als Antikörperbildungsstätte zu dienen.

In der modernen Therapie war die Haut als Applikationsstelle für Antigenreize vor allem durch Müller, Sahli (intrakutane—subepidermale—Reize), Ponndorf (kutane Reize), Petruschki und Moro

perkutane Reize) in den Vordergrund gestellt worden, ohne daß für die Behauptung, den in der Haut angreifenden Reizen komme eine besondere biologische Wirksamkeit zu, experimentelle Grundlagen vorhanden waren.

Diese Lücke auszufüllen, war der Zweck der eingangs erwähnten Untersuchungen von Köhler und Heilmann. Diese beiden Autoren wählten für ihre vergleichenden Beobachtungen die Erzeugung des anaphylaktischen Zustandes, angeregt durch die Feststellung Bessaus (1), daß es bereits mit kleinsten Serummengen möglich sei, ein Individuum von der Haut aus zu sensibilisieren. Sie kommen auf Grund ihrer Versuche zu dem Schlusse, daß die Sensibilisierung des Menschen durch Serum von der Haut aus in gleichem Maße und bei gleichen Dosen erfolgt, wie bei der intravenösen Applikation, schränken aber ihre Resultate selbst ein durch Aufwerfen der Frage, ob nach intrakutaner Gabe möglicherweise bei vornehmlicher Bildung der Antikörper in den blutbildenden Organen nur eine besondere Anreicherung derselben in der Haut durch den dort gesetzten Reiz in Betracht komme.

Um diese Frage entscheiden zu können, war es notwendig, in vergleichenden Immunisierungsversuchen die Entstehung solcher Antikörper zu prüfen, die im Blutserum nachgewiesen und quantitativ gemessen werden können.

Hierfür kamen in erster Linie die Immunkörper, vor allem die leicht nachweisbaren Agglutinine, in Betracht.

Die ersten experimentellen Untersuchungen über die Bildungsstätten der Antikörper stammen von Pfeiffer und Marx (2); sie ergaben, daß die blutbildenden Organe, insbesondere die Milz, als Hauptentstehungsort der Antikörper anzusehen seien. Die Autoren konnten bereits am 3. bis 5. Tage an Kaninchen, die aktiv gegen Cholera immunisiert waren, im Milzpreßsaft Bakteriolysine nachweisen, während im Blut der Tiere noch keine oder sehr viel weniger vorhanden waren.

Bei passiver Immunisierung erwies sich die Milz nicht als besonders antikörperreich; es konnte also ausgeschlossen werden, daß nur eine Anreicherung der Antikörper in den blutbildenden Organen stattfände. Die Behauptung Wassermanns und Citrons (3), daß auch andere Zellen, z. B. die das Peritoneum und die Pleura auskleidenden Zellen, sowie Bindegewebszellen die Bildung der Antikörper übernehmen könnten, wurde von Paetsch (4) bezüglich der Endothelien von Peritoneum und Pleura nachgeprüft und widerlegt.

Nun ist, wie eingangs erwähnt, in letzter Zeit der Haut von einigen Autoren eine Sonderstellung eingeräumt und von ihr behauptet worden, daß sie nicht nur schützende Wirkungen nach außen als Deckorgan habe, sondern auch nach innen Stoffe absondere, die aktive Schutzwirkungen gegen die Bakterien und ihre Gifte entfalteten (Esophylaxie Hoffmanns[1]).

Untersuchungen in dieser Richtung am Menschen stellte Moral (5) an, er verglich in einer Versuchsreihe die durch subkutane und intrakutane Injektion eines Typhusimpfstoffes erzielten Agglutinationstiter. Auf Grund seiner Versuche kommt er zu der Ueberzeugung, daß die intrakutan Geimpften vielleicht den gleichen, jedenfalls keinen besseren Antikörpergehalt erlangen können, als die subkutan Geimpften. Allerdings ist seine Versuchsreihe recht klein und zeigt so große Schwan-

1) Betreffs näherer Literaturangaben siehe Köhler u. Heilmann (l. c.)

kungen, daß er kein sicheres Urteil gewinnen konnte. Größere Versuchsreihen an Menschen und Meerschweinchen stellte Krauspe (6) an, der ebenfalls mit Typhusimpfstoff mehrmals perkutan, intrakutan und subkutan impfte. Er erreichte stärkste Agglutination bei subkutaner Anwendung. Bei intrakutaner Injektion war die erzielte Titerhöhe etwas niedriger, während sie bei perkutaner Einreibung der doppelten Impfstoffmenge erheblich hinter der der beiden angeführten Applikationsarten zurückblieb. Seine Resultate gewann er auf Grund mehrfacher Impfung. Will man jedoch genaue Vergleichswerte haben, so ist es u. E. notwendig, mit der Dosis immunisatoria minima zu arbeiten, d. h. genau abgemessene kleinste Dosen zu verwenden, die eben eine deutliche Agglutininbildung ergeben, während die gleiche Menge bei einem weniger günstigen Injektionsmodus noch keine oder doch nur höchst spärliche Produktion von Antikörpern ergibt. Dies ist um so mehr nötig, als bei größeren Antigenmengen die erreichte Titerhöhe diesen nicht unmittelbar entspricht, sondern noch größeren individuellen Schwankungen unterliegt, als das schon im allgemeinen auch bei Verwendung kleinster, eben wirksamer Antigenmengen der Fall ist. Diesen Fehler vermieden Stahl und Winkler (7), die mit der Dosis minima efficax eines Typhusvakzins kutan, perkutan und subkutan impften. Sie erreichten dabei in folgender Reihe immer geringere Agglutinationstiter: subkutan $>$ intrakutan $\geq$ perkutan, und kaum Agglutininbildung bei kutaner Impfung, bei der sie doppelte Antigenmengen verwendet hatten. Jedoch zogen sie aus den Resultaten der Versuche keine Rückschlüsse über die Bildungsstätten der Agglutinine.

Gegen ihre Versuchsanordnung läßt sich folgender Einwand erheben: Bei der subkutanen Injektion wird das Antigen in die unmittelbare Nähe der Haut gebracht, außerdem kommt es beim Ein- und Ausstich teilweise direkt ins kutane Gewebe, so daß immerhin ein Teil der Antikörper dabei durch die Haut direkt gebildet werden konnte. Diesen Fehler galt es zu vermeiden.

Wir stellten mehrere Versuchsreihen an Kindern an; die Impfungen wurden einerseits intrakutan, andererseits intramuskulär mit einem Ruhrvakzin vorgenommen. Wir wählten die intramuskuläre Darreichungsweise, um bei ihr die Berührung der Hautzellen mit dem Antigen nach Möglichkeit zu vermeiden; die an sich zu bevorzugende intravenöse Einverleibung des Vakzins schien uns nicht unbedenklich, auch nicht unbedingt notwendig, da die intramuskuläre Applikation eine genügend schnelle Resorption gewährleistet. Einen Ruhrimpfstoff verwendeten wir, weil sich die Ruhrbazillen bekanntlich durch sehr deutliche und grobflockige Agglutination auszeichnen; Flexner-Bazillen wählten wir ihrer relativen Ungiftigkeit wegen.

Es wurden Kinder im Alter von 3—13 Jahren ausgesucht, die als Rekonvaleszenten in der Klinik waren, sich subjektiv wohl befanden und keine febrilen Temperaturen zeigten. Zur Impfstoffherstellung wurde die 24stünd. Agarkultur eines Dysenteriebazillus (Flexner) verwendet. Es wurde davon eine Normalöse (2 mg) in 10 ccm physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt, und die Aufschwemmung bei 57° während 1 Std. versenkt im Wasserbade gehalten. Abimpfungen in Bouillon und auf Nähragar waren nach 24- und 48stünd. Bebrütung bei 37° steril. Von dem so bereiteten Impfstoff wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt. Zur Impfung wurden eine gutschließende Rekordspritze und für die intrakutane Applikation feinste Nadeln ver-

wendet, so daß ein quantitatives Arbeiten garantiert war. Intrakutan wurde stets die Antigenmenge in 0,1 ccm, intramuskulär die gleiche Dosis in 1,0 ccm gespritzt. Um aber bei intramuskulärer Impfung eine Berührung der Haut mit dem Antigen sicher zu vermeiden, wurde zunächst mit einer mit physiol. Kochsalzlösung gefüllten Spritze eingestochen, 0,5 ccm vorgespritzt, dann bei liegender Nadel die Spritze ausgewechselt und das Antigen appliziert, hierauf die Spritze abermals gewechselt und wieder 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung nachgespritzt, darauf wurde erst die Nadel entfernt. Es wurde dadurch erreicht, daß die Haut weder beim Einstich noch beim Herausziehen der Nadel mit dem Vakzin in Berührung kam. Vor der Impfung wurde der Anfangstiter der Kinder für den angewendeten Impfstamm bestimmt und dann am 6., 9. und 12. Tage der Anstieg des Agglutinationstiters gemessen. Die Anstellung der Agglutinationsproben erfolgte in Serumverdünnungen 1:20, 1:40, 1:80 usw. mit 24stünd. Agarkulturenaufschwemmungen desselben Ruhrstammes, der zur Impfung Anwendung gefunden hatte. Die Reaktion wurde in der üblichen Weise nach 2stünd. Aufenthalte im Brutschrank und weiteren 22 Std. bei Zimmertemperatur abgelesen.

In der 1. Serie wurden 6 Kinder, teils intramuskulär, teils intrakutan geimpft; es wurden jedem Kinde $^1/_{1000}$ Normalöse einverleibt und möglichst gleichaltrige Kinder gegenübergestellt.

Versuch Ia.

Intramuskulär	0. Tag	6. Tag	9. Tag	12. Tag
J. St., 7 J., chron. Bronchitis	—	20 +	20 +	20 +
W. St., 5 J., Skrofulose	—	—	—	—
H. M., 3 J., Pleurit. Tbc.	—	—	—	—
Intrakutan				
E. L., 7 J., Lues cong.	40 ±	40 ±	—	—
A. M., 5 J., Abdom. Tbc.	—	—	—	20 ±
R. E., 4 J., Mangel häuslicher Pflege	20 ±	40 ±	—	20 ±

Es wurde noch ein 2. Versuch (Ib) mit dem Impfstoff in gleicher Konzentration angeschlossen, für den Kinder gewählt wurden, deren Serum schon vor der Immunisierung eine ziemlich starke Agglutination bewirkte. Es sollte dabei geprüft werden, ob diese Kinder, deren Serum bereits Agglutinine enthielt, auf sonst unwirksame Antigenmengen bei dem einen oder anderen Injektionsmodus leichtere und schnellere Reaktionsbereitschaft und -fähigkeit zeigen würden.

Versuch Ib.

Intramuskulär	0. Tag	6. Tag	9. Tag	12. Tag
W., 10 J., Bronchialdrüsentuberk.	160 ±	160 ±	160 ±	320 ±
S., 5 J., Spin. Kinderlähmung	160 ±	160 ±	160 ±	320 ±
Intrakutan				
T., 12 J., Bronchialdrüsentuberk.	160 ±	160 ±	160 ±	80 ±
F., 8 J., Enuresis noct.	160 ±	160 ±	160 ±	160 ±
T., 3 J., Scharlach	160 ±	160 ±	160 ±	—

Aus Versuch I geht hervor, daß $^1/_{1000}$ Oese sowohl intramuskulär wie intrakutan kein wesentliches Ansteigen des Agglutinationstiters bedingte, also beide Male unter der wirksamen Dosis lag.

Daraufhin wurde in einer weiteren Serie von 6 Kindern in der gleichen Weise mit $^1/_{500}$ Normalöse geimpft:

Versuch II.

Intramuskulär	0. Tag	6. Tag	9. Tag	12. Tag
E. R., 12 J., Bronchialdrüsentuberk.	—	80 ±	80 ±	80 ±
G. T., 9 J., "	40 ±	80 ±	80 ±	80 ±
G. H.[1]), 6 J., Abd.Tbc. "	—	—	20 ±	40 ±
Intrakutan				
G., 12 J., Epilepsie	40 ±	40 ±	80 ±	80 ±
J. K., 10 J., Vit. cordis	40 ±	40 ±	80 ±	+
J., 8 J., Lues cong.	80 ±	80 ±	160 ±	160 ±

Hierbei zeigt sich nun sowohl bei den intramuskulär wie bei den intrakutan Geimpften ein, wenn auch schwaches, doch fast gleichmäßiges Ansteigen des Agglutinationstiters. Damit war mit $^1/_{500}$ Normalöse die Dosis minima immunisatoria gefunden. Da die Ausschläge jedoch gering waren, wurde der Versuch mit doppelter Dosis noch einmal wiederholt, um festzustellen, ob sich dabei ein gleichmäßiges Ansteigen des Titers sowohl in Höhe wie Geschwindigkeit zeigen würde. Es wurden also in einer 3. Serie abermals 6 Kinder mit $^1/_{250}$ Normalöse in der gleichen Weise behandelt:

Versuch III.

Intramuskulär	0. Tag	6. Tag	9. Tag	12. Tag
H. H. 9 J., Enuresis noct.	40 ±	40 ±	80 ±	160 ±
E. L., 8 J., " "	40 ±	40 ±	320 ±	320 ±
E. L., 8 J., Abdom.-Tbc."	40 ±	40 ±	80 ±	320 ±
Intrakutan				
J. J., 13 J., Epilepsie	80 ±	80 ±	160 ±	160 ±
H., 6 J., Bronchialdrüsentuberk.	20 ±	40 ±	80 ±	80 ±
D. B., 4 J., Scharlach	20 ±	40 ±	80 ±	80 ±

Hier traten schon deutliche Agglutinationen auf, ohne daß man mit Sicherheit eine Ueberlegenheit der einen oder der anderen Gruppe bei der Antikörperbildung herauslesen konnte, vielleicht daß die der intramuskulär Geimpften ein klein wenig überlegen ist. Auf jeden Fall läßt sich auf Grund dieser Versuche sagen, daß eine Immunisierung des Gesamtorganismus auf intrakutanem Wege, also von der Haut aus, durchaus möglich ist, daß aber die Haut keine Sonderstellung bei der Antikörperbildung einnimmt.

Ein Einwand läßt sich gegen die von uns verwendete Versuchsanordnung erheben. Während das intramuskulär einverleibte Antigen im ganzen Körper verteilt wird, und so an die Zellen des blutbildenden Apparates nur minimale Mengen gelangen, müssen wir annehmen, daß in Analogie mit anderen kolloidal gelösten Stoffen (Serumeiweiß, Tuberkulin) bei intrakutaner Applikation das Antigen sich am Orte der Injektion lange in hoher Konzentration hält, so daß auf die Hautzellen also bedeutend stärkere Reize einwirken als auf die Zellen im Gesamtorganismus bei intramuskulärer Einverleibung. Um über die Bedeutung dieses Einwandes Aufschluß zu erhalten, stellten wir noch einige ergänzende Versuche an. Es wurde wiederum bei 2mal 6 Kindern, deren Anfangstiter vorher geprüft war, teils $^1/_{250}$ Normalöse an einer Stelle intrakutan appliziert, teils dieselbe Menge in 10 Dosen von je $^1/_{2500}$ Normalöse intrakutan verteilt. Es wurde also nicht die Dosis minima, mit der gerade noch Agglutination zu erlangen war, sondern die Dosis genommen, mit der in der 1. Versuchshälfte eine

1) Dieses Kind erkrankte 3 Wochen später an einer Meningitis tbc.

sichere Agglutination erhalten wurde. Damit wurde also insgesamt eine Antigenmenge in die Haut gebracht, die sich zur Erzeugung von Agglutininen als hinreichend erwiesen hatte, hingegen lag die an jeder Applikationsstelle mit den Hautzellen in Berührung gebrachte Antigenmenge weit unter der Dosis immunisatoria minima. Bei dieser Versuchsanordnung wird zwar an den Hautzellen nicht jene Verdünnung des Antigens erreicht, wie sie an den Zellen des Gesamtorganismus bei der intramuskulären Injektion erzielt wird, bei der natürlich nur minimale Spuren des Bakterienantigens mit den einzelnen Zellen in Kontakt treten können. Aus dem Ergebnis der Versuche IVa und b erhellt indes die bemerkenswerte Tatsache, daß durch die Summation von Antigenreizen in der Haut, die einzeln unter der wirksamen Dosis liegen, der gleiche Effekt erzielt wird, wie bei konzentrierter Zuführung an einer Stelle, wenn nur die Gesamtmenge des verteilt zugeführten Antigens die Dosis immunisatoria erreicht.

Versuch IVa.

10mal $^1/_{2500}$ Oese	0. Tag	6. Tag	9. Tag	12. Tag
K. F., 13 J., Gonit. luetica	40 ±	40 ±	80 ±	160 ±
H. N., 13 J., Lues cong.	20 ±	20 ±	40 ±	20 ±
M. B., 9 J., Enuresis noct.	20 ±	20 ±	40 ±	640 ±
1mal $^1/_{250}$ Oese				
H. R., 8 J., Pneumonie	40 ±	40 ±	—	1280 ±
H. S., 7 J., „	20 ±	80 ±	640 ±	1280 ±
B. B., 4 J., Pertussis	40 ±	20 ±	160 ±	320 ±

Versuch IVb.

10mal $^1/_{2500}$ Oese	0. Tag	6. Tag	9. Tag	12. Tag
H. R., 10 J., Pleur. cox. ac.	40 ±	40 ±	80 ±	320 ±
R. G., 5 J., Enuresis noct.	40 ±	20 ±	160 ±	640 ±
Eh. E., 4 J., Bronchialdrüsentuberk.	40 ±	—	80 ±	320 ±
1mal $^1/_{250}$ Oese				
L. P., 10 J., Bronchialdrüsentuberk.	40 ±	40 ±	320 ±	320 ±
O. V., 7 J., Skabiesekzem	40 ±	—	20 ±	160 ±
R. K., 3 J., Gonorrhöe	40 ±	20 ±	160 ±	320 ±

Betrachten wir die Resultate unserer Versuche in der Gesamtheit, so ergibt sich, daß man bei intrakutaner Applikation des Antigens, ob es nun an einer Stelle konzentriert, oder durch Verteilung auf mehrere Stellen verdünnt in den Zellkomplex der Haut gebracht wird, den gleichen Agglutinationstiter erzielt wie bei intramuskulärer Einführung.

Es scheint der Schluß berechtigt, daß nicht die Konzentration des Impfstoffes an einem umschriebenen Bereich des antikörperbildenden Zellsystems, sondern die Gesamtmenge des zugeführten Antigens für die Antigenkörperbildung maßgebend ist.

Mit Sicherheit läßt sich eine Ueberlegenheit der Hautzellen in der Antikörperbildung verneinen.

Erfolgt nun die Antikörperbildung bei intrakutaner Einverleibung des Impfstoffes wirklich durch die Tätigkeit der Hautzellen, mit denen das Antigen in Berührung kommt? Diese Frage läßt sich auf Grund unserer Ergebnisse nicht mit Sicherheit entscheiden.

Neuhaus und Prausnitz (8) konnten bei Tierversuchen an Kaninchen mit Cholera-Impfstoff, in denen sie mit der Versuchsanordnung von Pfeiffer und Marx (l. c.) den agglutinatorischen und bakteriolytischen Titer von Serum und Hautpreßsaft verglichen, zeigen, daß zu einer Zeit, in der das Serum eine nennenswerte Menge von Antikörpern aufweist, im Hautpreßsaft keine oder nur Spuren davon

nachweisbar sind. Dieses Verhalten blieb gleich, ob sie das Antigen intrakutan oder intravenös zuführten, sogar der Preßsaft der mit dem Impfstoff in Berührung gekommenen Hautstelle verhielt sich nicht anders als die übrige Haut. Dabei ergab auch ihnen die intrakutane und intravenöse Antigenapplikation analog unseren Befunden im Serum einen gleich raschen und gleich hohen Anstieg des Antikörperstiters.

Damit scheint die Bildung von Schutzstoffen durch die Haut im negativen Sinne entschieden zu sein. Und doch lassen sich Tatsachen und Beobachtungen anführen, die bei der von uns verwendeten Versuchsanordnung für eine Antigenkörperentstehung in der Haut selbst sprechen.

In sämtlichen Versuchsreihen steigt der Agglutinationstiter gleich schnell und zu etwa gleicher Höhe unabhängig vom Impfmodus an, und für beide von uns gewählten Applikationsarten ist die Dosis efficax die gleiche. Für dieses Resultat gibt es nur 2 Erklärungsmöglichkeiten: Entweder bilden die Zellen der menschlichen Haut, die mit dem Antigen in Berührung kommen, Antikörper, oder die Resorption des Antigens muß von der Haut aus ebenso schnell erfolgen wie aus dem Muskel. Dagegen spricht eine Reihe von Beobachtungen bei der Zuführung anderer kolloidal gelöster Stoffe, wir nennen nur Tuberkulin und Serum, von denen bekannt ist, daß sie, intrakatun zugeführt, tagelang in der Haut in nächster Nähe der Applikationsstelle liegen bleiben.

Ferner konnten R. Pfeiffer und Bessau (9) für den Spezialfall der Vakzine (Typhus) zeigen, daß zwar das bakteriolysogene Prinzip bei Abtötung durch Hitzeeinwirkung (58° 1 Std. lang) fast restlos in Lösung geht, das agglutinogene hingegen, auf das es in unseren Versuchen ankommt, fester an die schwerer resorbierbaren Bazillenleiber gebunden ist.

Eine Lösung der Frage, ob die Haut Antikörper zu bilden vermag, scheint uns demnach für die menschliche Haut noch auszustehen, wir behalten uns Versuche darüber im Sinne der Neuhaus-Prausnitzschen und durch Prüfung der Resorbierbarkeit der einzelnen Bestandteile des Antigens durch die menschliche Haut vor.

In welche Organe auch immer die Bildung der Antikörper verlegt werden mag, es bleibt die Frage offen, durch welche Zellsysteme sie letzten Endes erzeugt werden. Wir dürfen die Haut nicht als funktionell einheitliches Organ ansehen, sondern müssen uns vor Augen halten, daß sie einen morphologisch und funktionell außerordentlich komplizierten Zellverband darstellt. Es ist die Erklärung möglich, daß eine hochdifferenzierte Zellart, sei es in den blutbildenden Organen, der Haut, dem Bindegewebe oder anderen Organsystemen, die für die Antikörperentstehung herangezogen worden sind, auf den Reiz des zugeführten Antigens mit der Bildung der Immunkörper antwortet. Vielleicht kommt diese Aufgabe den Gefäßendothelzellen zu, wie es bereits Bessau für die Antikörperbildung und für die Entstehung der Tuberkulinempfindlichkeit (Naturforscherversammlung 1924 Innsbruck) ausgesprochen hat, und wie auch wohl Neufeld und Meyer (10) annehmen, wenn sie das retikulo-endotheliale System als Bildungsstätte der Antikörper ansehen.

Für die aktive Immunisierung gegenüber Infektionskrankheiten wird vielleicht die praktische Folgerung möglich sein, daß bei intra-

kutaner Zuführung des Antigens unter Vermeidung von Allgemeinerscheinungen ein hinreichender Schutz erzielt werden kann.

Versuche darüber sind noch im Gange; einen vorläufigen Bericht über günstige praktische Ergebnisse der aktiven intrakutanen Ruhrschutzimpfung der Säuglinge hat Bessau auf der Tagung der Sächsisch-Thüringischen Kinderärzte 30. 11. 1924[1]) bereits erstattet.

Zusammenfassung.

1) Bei quantitativem Vergleich intrakutaner und intramuskulärer Impfung mit Ruhrvakzin zeigt sich, daß bei intrakutaner Applikation fast ebenso gute, jedoch niemals bessere Versuchsergebnisse zu erzielen sind, wie bei intramuskulärer Zuführung. Ist damit auch kein strenger Beweis erbracht, daß Zellen der Haut selbst Antikörper erzeugen, so ist dies bei dem gleich raschen und gleich hohen Ansteigen des Titers immerhin sehr wahrscheinlich. Eine ebenso schnelle Resorption und Verbreitung im ganzen Organismus bei intrakutaner Einverleibung wie bei intramuskulärer ist kaum vorstellbar. Das Verhalten anderer kolloidal gelöster Stoffe, z. B. Tuberkulin oder Serum, stützt diese Vorstellung. — 2) Auch bei intrakutaner Zuführung ist für den Immunisierungserfolg nur die Gesamtmenge des zugeführten Antigens von Bedeutung, nicht die lokale Konzentration. — 3) Es wird die Annahme gemacht, daß nicht der Zellkomplex eines Organes, sondern eine bestimmte hochdifferenzierte Zellart, vielleicht die Gefäßwandzelle, auf den Antigenreiz mit der Produktion von Antikörpern antwortet. — 4) Die Tatsache, daß auch von der Haut aus Immunkörperbildung angeregt werden kann, läßt sich praktisch für die aktive Immunisierung verwerten, indem diese bei intrakutaner Zuführung des Antigens unter Vermeidung von Allgemeinreaktionen zu erreichen ist.

Literatur.

1) Bessau, Jahrb. f. Kdhlkd. Bd. 81. S. 532. — 2) Pfeiffer u. Marx, Ztschr. f. Hyg. Bd. 27. 1898. S. 272. — 3) Wassermann u. Citron, Ibid. Bd. 50. 1905. S. 331. — 4) Paetsch, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 60. 1911. S. 255. — 5) Moral, Med. Klin. 1923. S. 1229. — 6) Krauspe, Dtsch. Med. Woch. 1923. S. 1921. — 7) Stahl u. Winkler, Ibid. 1923. S. 1436. — 8) Neuhaus u. Prausnitz, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. H. 6, S. 444. — Pfeiffer u. Bessau, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 64. 1912. S. 172. — 10) Neufeld u. Meyer, Ztschr. f. Hyg. Bd. 103. S. 595.

1) Ref. Dtsch. Med. Woch. 1925. S. 255.

Nachdruck verboten.

Zur Technik der subduralen Impfung mit Organemulsionen.

[Aus der II. med. Univ.-Klinik in Wien (Vorstand: Prof. Dr. Ortner).]

Von **Nikolaus Kovács.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Im Rahmen systematischer Untersuchungen über filtrierbare Virusarten, welche an unserer Klinik von den Arbeiten Luger und Laudas über das Herpesvirus ihren Ausgang genommen haben, sah ich mich veranlaßt, mich eingehend mit der Technik der subduralen bzw. intrazerebralen Impfung der üblichen Versuchstiere zu beschäftigen.

Jede Methode, welche sich das Studium der filtrierbaren Virusarten zum Ziele setzt, hat besonders 2 wichtige Voraussetzungen: Die Einfachheit und die höchstmögliche Sterilität. Bei den neurotropen Virusarten spielt die Gehirn- und Rückenmarkspassage die Hauptrolle. Die experimentelle Impfung kann direkt, durch subdurale oder intrazerebrale Impfung, oder aber indirekt: intravenös, intraperitoneal, subkutan usw. geschehen. Die meistgebrauchte Methode der direkten Infektion ist die subdurale. Es gibt aber einen Fall, wo dieser Weg auf technische Schwierigkeiten stößt, d. i. die Impfung der Mäuse. Durch die Kleinheit des Subduralraumes ist mit den üblichen Methoden eine subdurale Impfung fast ausgeschlossen und in den meisten Fällen handelt es sich um eine intrazerebrale Impfung, welche selbstverständlich immer mit einer Zelläsion und den sich aus dieser ergebenden histologischen Veränderungen einhergeht, welche gerade mit Rücksicht auf die zu findenden spezifischen histologischen Veränderungen nach Tunlichkeit vermieden werden soll. Es handelt sich also darum, eine Verletzung des Gehirnes, wenn vielleicht eine solche auch nicht vollständig zu vermeiden ist, doch nach Möglichkeit zu beschränken.

Wenn man eine ganz dünne Rekordnadel von ihrem Ansatzstück so weit schräg abschleifen läßt, so daß die Nadel von ihrer Spitze bis zu dem Ansatzstück 4 mm lang wird und mit dieser Nadel nach Enthaarung, Jodierung der Impfstelle und nach Spaltung des Perikraniums mit leicht bohrenden Bewegungen den Schädel durchsetzt — bei Mäusen trepanieren wir nicht — so erreicht man durch die Kürze der Nadel eine bessere Fixierung derselben, so daß man im Moment der Durchtrennung des Schädeldaches nicht in das Gehirn hineinfährt. und ebenso eine bessere Kontrolle der bereits durchbohrten Schädelschicht, außerdem ein viel leichteres Arbeiten, nachdem die gewöhnliche Nadel infolge ihrer Länge und Feinheit, wenn sie auf ein etwas härteres Schädelstück stößt, sich immer etwas biegt. Die Benützung der beschriebenen Nadel erwies sich uns besonders, wenn man täglich ein größeres Material zu impfen hat, als äußerst zweckmäßig.

Bei den eingegangenen oder getöteten Mäusen ist die sterile Entnahme des Gehirns für weitere Passagen, für bakteriologische Untersuchungen oder für Aufbewahrung als Glyzerinvira notwendig. Dies kann mit einer sehr einfachen Methode geschehen. Mit einer Schere, welche nicht einmal steril sein muß, wird, nach zweckmäßigem Befeuchten des Felles mit Sublimat-Alkohol, eine an dem Rücken der Maus aufgehobene Hautfalte durchtrennt; und jetzt die kopfwärts zu liegende Rückenhaut umgekrempelt und abgezogen. Wenn

man die Haut bis zum Hals entfernt hat, kann man leicht den Kopf durch Druck von vorne, wobei man die Rückenhaut immer festhält, nach rückwärts unter die Haut durchschieben. Dadurch erreicht man, daß der Schädel absolut steril zum Vorschein kommt und diesen kann man dann mit einer kleinen sterilen Schere aufklappen und das Gehirn entnehmen. Beim Herunterziehen der Haut läßt sich ohne weiteres eine Verletzung des äußeren Gehörganges vermeiden, was eine Gefährdung der Sterilität bedeuten würde. Die Methode hat außer der Einfachheit gegenüber der üblichen Spaltung der Schädelhaut und darauffolgenden Abbrennens des Schädeldaches den Vorzug, daß nicht, wie es beim Abbrennen mitunter der Fall sein kann, durch die Erwärmung des Schädeldaches der Mäuse histologische Veränderungen verursacht werden.

Die weitere sterile Verarbeitung des Gehirnes zu einer neuen Passage geschieht durch Herstellung einer Emulsion. Dies erfolgt durch Verreibung in einer sterilen Reibschale mit oder ohne sterilen Sand. Bisher hat man sich damit begnügt, daß man den Deckel einer sterilen Petrischale oder das Papier, in dem die Reibschale sterilisiert war, darüber gehalten hat und damit das Hereinfallen von Luftkeimen auszuschalten versuchte. Wenigstens ist in einschlägigen Lehr- und Handbüchern und Spezialarbeiten, außer den komplizierten Apparaten, teilweise mit trocken nicht sterilisierbaren Gummiabdichtungen, nichts über ein einfaches und einwandfreies Verfahren zu finden. Es ist klar, daß eine Verreibung, bei welcher man das Pistille nicht über, sondern an der Seite der Reibfläche halten muß, umständlich ist. Ebensowenig ist bei dieser Art des Vorgehens die Sterilität gesichert. Die im folgenden zu beschreibende einfache und billige Vorrichtung zu einer gewöhnlichen Reibschale erlaubt demgegenüber ein leichtes und absolut steriles Arbeiten[1]).

Fig.

Ueber der Reibschale steht eine kleine Glasglocke mit einem Hals, welcher mit einem Leinwandstück verschlossen ist (s. Fig.). Das Leinwandstück, welches in der Mitte ein Loch hat, durch das das Pistille durchgezogen und durch Umbinden befestigt ist, darf nicht über den Hals ausgespannt werden, sondern muß ganz lose sitzen, so daß es eine unbeschränkte Bewegung des Pistilles erlaubt. Die Glocke ist so gebaut, daß sie auf der Reibschale reitet und auf diese Weise dieselbe auf der Unterlage fixiert. Die Glasglocke ermöglicht ferner jederzeit die Beobachtung des zu verreibenden Materials[2]).

Reibschale, Pistille und Glocke werden montiert trocken sterilisiert und erlauben eine einfache und sichere Verarbeitung des Gehirnes. Die Vorrichtung ist selbstverständlich auch für die Verarbeitung von anderen Organen oder sonstigen Materiales verwendbar.

Wenn es auch möglich ist, daß in manchen Laboratorien ähnliche Vorrichtungen in Verwendung stehen, scheint es doch vielleicht berechtigt, diese kleine Apparatur ausführlicher zu schildern, da auch in dieser Richtung eine Einheitlichkeit der Untersuchungsmethodik einen Vorteil bedeutet.

1) Der Apparat wurde in der Sitzung der Vereinigung der pathologischen Anatomen Wiens am 21. Dezember 1924 demonstriert.

2) Die Glasglocke ist mit oder ohne Reibschale bei der Firma Paul Haack, Wien 9, Garelligasse 4, zu beziehen.

Nachdruck verboten.

Zur Züchtung der Anaëroben.

[Aus dem Hygienischen Institute der Universität Innsbruck.]

Von Prof. **Alois Lode.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Unter den Methoden der Züchtung anaërober Bakterien ist, wie unlängst Zeißler mit Recht hervorgehoben hat, die Verbindung der Luftentfernung mit der Absorption des Restsauerstoffes durch eine alkalische Pyrogalluslösung die bequemste und leistungsfähigste. Zur Durchführung empfahl Zeißler (1) den Exsikkator nach Maassen, der, ähnlich, wie der Exsikkator von Hempel, einen an den zylindrischen Unterteil durch kreisförmige Schlifflächen ansetzbaren Helm mit einer Rinne besitzt, in welcher die Pyrogalluslösung mit der Lauge zur Mischung gelangt. Wie schon ausführlich O. Kirchner (2) schilderte, ergeben sich aber bei der Dichtung für den Mindergeübten erhebliche Schwierigkeiten. Auch im hiesigen Institute erwiesen sich verschiedene Abdichtungsmittel, insbesondere auch die von Zeissler angegebene Mischung von Rindertalg, gelber Vaseline und Toluol zu gleichen Teilen, nicht zuverlässig, sobald die Exsikkatoren bei hohem Vakuum in die Brutofenwärme gebracht wurden. Dieses Versagen war um so unangenehmer, als der Exsikkator äußerlich nicht die mißglückte Dichtung anzeigt.

Mit einem Schlage wurden die Ergebnisse tadellos, sobald wir an Stelle der Exsikkatoren Einmachgläser mit Gummidichtung (Weckgläser) verwendeten, die von verschiedenen Glashütten unter den Namen Rex, Siemensglas, Gisun zu verhältnismäßig billigen Preisen im Handel vorkommen. Das Wesentliche ist, daß der auf dem flachen, geschliffenen Rande des Konservenglases ruhende Gummiring durch die Kante des übergreifenden Deckels angepreßt wird. Zwei flache Schlifflächen vermag man dagegen durch einen Gummiring nicht mit Sicherheit, ohne die von Kirchner empfohlenen Drahtringe zu dichten.

Wenn man schon beim Kaufe mangelhaft aufeinanderpassende Gläser oder solche mit ausgesprungenen Rändern zurückweist, so ist der Erfolg ein zuverlässiger und das erzielte Vakuum noch nach Wochen im Brutofen unverändert. Da die Verwendung der Einmachgläser, bzw. das bei diesen verwendete Prinzip der Gummidichtung, 1924 von verschiedenen Autoren (3) als geeignet für die Züchtung der Anaëroben bezeichnet wurde, könnte eine neue Empfehlung als überflüssig erscheinen, wenn nicht die von uns erprobte Anordnung hinsichtlich der Beschickung des Apparates mit der Pyrogalluslösung als Verbesserung der bisher empfohlenen Verfahren sich uns erwiesen hätte. Zur Erreichung dieses Zweckes wurde bisher nach den Angaben der Literatur verschieden verfahren. O. Zeißler (4) stellt die Exsikkatorglocke während der Luftabsaugung schräg auf und hält in der Rinne des Helmes an höchster Stelle das Pyrogallolpuver durch Wattebäuschchen fest, während an tiefster Stelle sich die Lauge befindet. Nach Beseitigung der Luft wird der Exsikkator gerade gestellt, die Pyrogallussäure gelöst und alkalisch gemacht. Hilger (5) gibt die Lauge in ein Röhr-

chen, stellt sie mittels eines Pappekragens schräg. Nach dem Evakuieren wird durch Neigen die Lauge über das Pyrogallulpulver gegosen. Abel (6) bedient sich eines kippbaren Wassergefäßes. Breckenfeld (7) wickelt die Pyrogallussäure in ein Blatt Papier (Taschennotizblock), so daß die unmittelbar vor der Luftentfernung eingebrachte Lauge nur langsam das Papier durchtränkt.

Unsere Anordnung ist aus folgender Schilderung und Skizze zu entnehmen: Als Exsikkatoren verwenden wir die in den Ausmaßen geeigneten Einmachgläser der Firma: Glas Industrie Schreiber und Neffen, die unter der Marke GISUN in den Größen von 1 Lit. ($12^1/_2$ cm hoch) und 2 Lit. (22 cm hoch) mit einem Durchmesser von

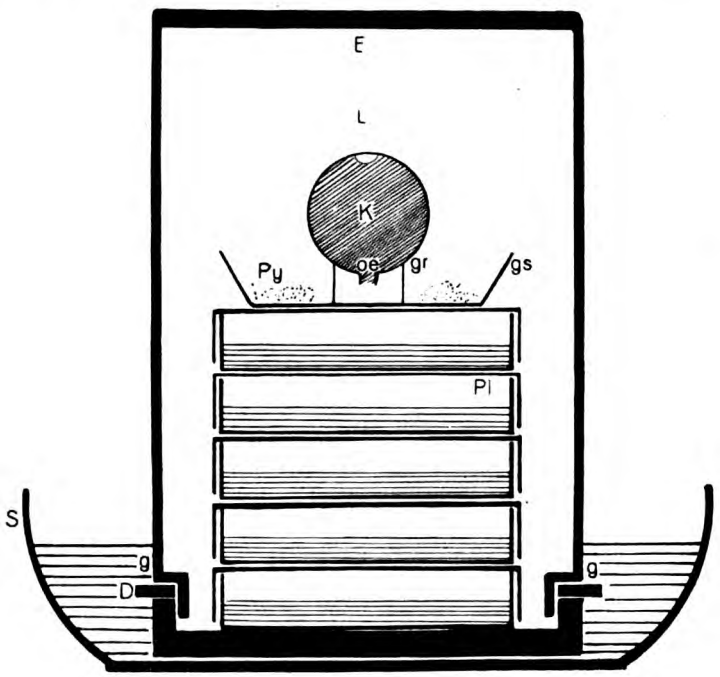


Fig. 1.

$10^1/_2$ cm erhältlich sind und 4 bzw. 10 nicht zu hohe Petrischalen aufzunehmen vermögen: Für Eprouvettenkulturen waren die 2 Lit. fassenden, ca. 25 cm hohen Rexgläser besser geeignet. Die Absaugung der Luft wurde unter der Glocke eines Exsikkators, welcher mit dem bei Zimmertemperatur ausgezeichnet wirkenden Schmiermittel für Hähne (geschmolzener Rohkautschuk, Vaseline, Paraffin 7:3:1) gedichtet war, mittels einer Egerschen Wasserstrahlpumpe bei einem Wasserdruck von meist 5 Atmosphären vollzogen.

Bei dem hohen und verläßlich haltenden Vakuum ist zur Absorption des Restsauerstoffes nur eine geringe Menge der Pyrgallussäure notwendig, die in einer Quantität von etwa 1 g auch für das 2 Lit. haltende Einmachglas ausreicht. Das Präparat wird als trockenes

Pulver (*Py*[1]) in eine ca. 7 cm im Durchmesser und ca. 3 cm in der Höhe betragende Glasschale (*gs*) gegeben, sodann in dieselbe Schale mittels eines aus einem ca. 2 ccm weitem Glasrohre hergestellten Glasringes (*gr*) eine Glaskugel (*K*) so aufgestellt, daß die etwa 2 mm im Durchmesser betragende Kugelöffnung (*Oe*) nach abwärts gerichtet ist. In die ca. 10—12 ccm fassende Kugel wird 20proz. Natronlauge mittels eines Kapillartrichters gefüllt. Man hat nur darauf zu achten, daß die Kugel nicht vollständig gefüllt wird, sondern eine Luftblase (*L*) von Stecknadelkopfgröße frei bleibt, die, wenn die Kugel mit der Oeffnung nach abwärts auf den Ring gestellt wird, an die Kuppe der Kugel eilt. Die Flüssigkeit in der Kugel wird durch den Luftdruck getragen. Erst wenn die Luftverdünnung im Exsikkator und demnach auch im Einmacheglase höhere Grade erreicht, dehnt sich die bis dahin kleine Luftblase aus und verdrängt die Lauge, die, auf die Pyrogallussäure fallend, diese löst und erst zur Sauerstoffabsorption geeignet macht. Die Entleerung der Kugel erfolgt erst dann, wenn ein hoher Grad des Vakuums erreicht ist, weshalb sich auch die Anordnung als geeignet erweist, den Zeitpunkt der vollzogenen Evakuation anzuzeigen. Andererseits bietet die Entleerung der Kugel, die erst bei hohem Vakuum erfolgt, die Gewähr, daß die Pyrogallussäure nur wenig Restsauerstoff mehr vorfindet, so daß sie meist nur dunkel weingelb gefärbt wird. Der Ring, den die Kugel trägt, muß so hoch sein, daß deren Oeffnung nach der Entleerung aus der Pyrogalluslösung herausragt, weil sonst im Brutofen, wohl durch die Zunahme der Tension des Wasserdampfes, die Kugel sich wieder füllt und so die absorbierende Oberfläche der Lösung verkleinert wird. Das Anpressen des Deckels an das Einmachglas wird erreicht, indem man den luftleer gemachten Exsikkator durch Oeffnen des Hahnes rasch mit Luft füllt. Um einen allfälligen Fehler der Gummidichtung nicht zu übersehen, bauen wir die Petrischalen (*Pl*) und die Schale mit der Kugel auf den Deckel (*D*) des Einmachegefäßes (*E*) auf, so daß die Gummidichtung (*g*) nach abwärts sieht. Wenn man das Weckglas in einer Schale (*S*) im Brutofen aufstellt, welche so viel Wasser enthält, daß dieses den Gummiring überdeckt, so wird jede Undichtigkeit des Verschlusses sich sofort durch das in das Einmachgefäß eindringende Wasser verraten.

Literatur.

1) Zeißler, Kraus-Uhlenhuth, Handb. d. mikrobiol. Technik. Bd. 2. 1923. S. 1004. — 2) Kirchner, Zur Technik der Anaërobenzüchtung. II. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. S. 340.) — 3) Ders., loc. cit. Breckenfeld, Zur Technik der Anaërobenzüchtung I. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. S. 338.) Breckenfeld u. Kirchner, Demonstration auf d. Mikrobiol.-Tagung in Göttingen 1924. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. S. 258.) — 4) loc. cit. S. 1005. — 5) Hilger, Die Verwendung der Haushaltungsvakuumapparate in der Technik der Anaërobenzüchtung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. S. 557.) — 6) Abel, Bemerkungen zu Hilgers Erfahrungen über die Verwendung von Haushaltungsapparaten in der Technik der Anaërobenzüchtung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. S. 558.) — 7) Breckenfeld, Zur Technik der Anaërobenzüchtung. III. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. S. 129.)

1) Siehe die nebenstehende Zeichnung.

Nachdruck verboten.

Ein Vorschlag zur Steigerung der Leistung des Mikroskops.

Von **C. Troester**, Berlin-Lichterfelde.

Unter Leistung des Mikroskops verstehe ich das Vermögen, kleinste Objekte ihrer Form nach erkennbar zu machen. Dem Bakteriologen ist wenig damit gedient, wenn er mit dem Ultramikroskop oder im Dunkelfeld in einem Medium kleinste Körperchen als runde Beugungsscheibchen wahrnimmt, obwohl A. Szegvari (1) mit einer besonderen Blende auch an ultramikroskopischen Gebilden die Stäbchenform nachweisen konnte.

Bei der gewöhnlichen mikroskopischen Untersuchung wird die Grenze der Auflösbarkeit oder der Gestalterkennung kleinster Gebilde erreicht bei etwa 0,37 μ für zentrale und 0,19 μ für äußerste schiefe Beleuchtung. Von dieser machen die Bakteriologen allerdings nur sehr wenig Gebrauch, obwohl sie dem darin Geübten gute Dienste leisten kann. (Beim Arbeiten mit dem Abbeschen Kondensor muß man zur Nutzbarmachung sehr schief einfallender Strahlen zwischen Objektträger und Kondensor eine Wasser- oder Oelschicht einschalten.)

Nach Abbe ist der mathematische Ausdruck für die Grenze der Auflösbarkeit $\frac{\lambda}{2a}$, wo λ die Wellenlänge des benutzten Lichtes, a die numerische Apertur ($a = n \sin u$) bedeutet. Setzen wir den eingeklammerten Ausdruck für a ein, so erhalten wir den Bruch $\frac{\lambda}{2\,n \sin u}$. Darin ist u der halbe Oeffnungswinkel, n der Brechungsexponent des schwächst brechenden Mediums zwischen Objekt und Frontlinse des Objektivs. Bei Trockensystemen ist $n = 1$, bei Wasserimmersionssystemen $= 1{,}3$, und bei Oelimmersionen meistens $= 1{,}5$.

Will man das Auflösungsvermögen steigern, so muß man den Wert des Bruches $\frac{\lambda}{2\,n \cdot \sin u}$ verkleinern. Dazu kann man auf zwei Wegen gelangen. Einmal kann man den Zähler vermindern, d. h. mit Strahlen von kürzerer Wellenlänge arbeiten. Diesen Weg beschritt A. Koehler, indem er ultraviolettes Licht mit $\lambda = 0{,}275$ μ verwandte. Der hiermit erzielte Gewinn an Auflösungsvermögen ist beträchtlich, indem er die Grenze bei zentraler Beleuchtung auf 0,11 μ herabdrückt. Dieser Fortschritt ist aber nur erreichbar durch ein Mikroskop, dessen gesamte Optik aus Quarz besteht, weil die Strahlen von so geringer Wellenlänge nur von diesem Material vollständig durchgelassen werden.

Mit diesem Mikroskop gelang z. B. Prof. Frosch die Entdeckung des Erregers der Maul- und Klauenseuche, was um so mehr Beachtung verdient, als man beim Arbeiten mit dem Koehlerschen Apparat nicht direkt beobachtet, sondern auf ein gewissermaßen tastendes photographisches Verfahren angewiesen ist. Wie sehr die Forschung hierdurch erschwert wird, mag man in den bezüglichen Arbeiten von

Frosch nachlesen; es mußten große Reihen von Photogrammen aufgenommen werden, um das zu erreichen, was man beim direkten Sehen mit wenigen Blicken hätte wahrnehmen können.

Der zweite Weg zur Steigerung des Auflösungsvermögens liegt in der Vergrößerung des Nenners von $\frac{\lambda}{2 n \sin u}$. Mit sin u ist nichts anzufangen, da man mit dem Oeffnungswinkel schon an der Grenze des Erreichbaren angekommen ist. Es bleibt also nur die Vergrößerung von n übrig. Dieses hatte die Firma C. Zeiß schon vor Jahren versucht, indem sie eine Monobromnaphtalin-Immersion herstellte, bei welcher n den Betrag von 1,66 hatte. Der mit diesem System erreichte Fortschritt entsprach nicht den mit dem Gebrauch verbundenen Unbequemlichkeiten, weshalb es sich auch nicht eingebürgert hat.

In einem Vortrag (2) über seine Arbeiten mit dem Koehlerschen Quarzmikroskop sagt Frosch, daß man dieselbe Leistung in viel bequemerer Weise erreichen könnte mit einem Mikroskop, dessen ganze Optik aus Diamant bestünde. Allerdings, meint er, würde die praktische Ausführung dieser Idee an den unerschwinglichen Kosten scheitern. Nehmen wir einmal an, diese Kosten wären kein Hindernis, so ergibt sich allerdings ein beträchtlicher Gewinn an Auflösungsvermögen, denn der Brechungsexponent des Diamanten ist = 2,47. Um ihn voll auszunutzen, müßte man eine Immersionsflüssigkeit von demselben hohen Lichtbrechungsvermögen haben. Eine solche gibt es meines Wissens nicht, am nächsten kommt ihr eine Lösung von Quecksilberjodid in Anilin und Chinolin mit n = 2,20. Hiermit erhält man als Grenze des Auflösungsvermögens bei zentraler Beleuchtung und für weißes Licht den Wert von 0,13 μ, für blaues Licht 0,12 μ und photographisch wirksame Strahlen 0,10 μ.

Noch etwas weiter kann man kommen, wenn man Immersionsflüssigkeit und Deckglas ganz wegläßt und die Frontlinse so ausführt, daß man das Präparat direkt auf ihre ebene Außenfläche aufträgt, trocknen läßt, fixiert, event. färbt und die Scharfeinstellung durch ganz geringe Aenderungen der Tubuslänge bewirkt. Bei dieser Anordnung ist das Objekt mit der Frontlinse optisch homogen verbunden, es kommt also das hohe Brechungsvermögen des Diamanten voll zur Geltung, und man erhält bei zentraler Beleuchtung ein Auflösungsvermögen von 0,09 μ. Allerdings läßt sich das an der Frontlinse fixierte Präparat nicht verschieben, und wenn es nichts taugt, so muß man eben andere Präparate machen. Dafür ist aber auch eine brauchbare Stelle unverrückbar mit dem Mikroskop verbunden und kann also auch ohne weiteres photographische Beläge liefern. Infolge der außerordentlichen Härte des Diamanten wäre bei geeigneter Fassung der Frontlinse eine Beschädigung des Objektivs nicht zu befürchten. Dieses kann übrigens mit einem Präparatbelag in eine beliebige Flüssigkeit tauchen (Wasser, Salzlösungen, Oel), ohne daß dadurch die optische Wirkung beeinträchtigt wird.

Diese Ueberlegungen wären natürlich zwecklos, wenn wirklich die sämtlichen Linsen des Mikroskops aus Diamant bestehen müßten. Glücklicherweise ist es nicht ganz so schlimm, es genügt vielmehr, wenn die Frontlinse des Objektivs und unter Umständen noch das Deckglas aus diesem Stoff bestehen. Die Frontlinse ist ein sehr kleines Gebilde, und das Deckglas kann ein winziges Plättchen sein, oder

auch, wie ich oben gezeigt habe, ganz entbehrt werden. Man sieht aber, daß man mit dieser Einrichtung noch etwas weiter kommt als mit dem Quarzmikroskop. Dabei ist die Handhabung viel bequemer, und schließlich kann man das Diamantobjektiv an jedem Bakterienmikroskop verwenden, was auch ein nicht zu unterschätzender Vorteil ist.

Der Gedanke, Diamant zu Mikroskoplinsen zu benutzen, ist ziemlich alt, man ist nur bisher nicht näher darauf eingegangen wegen der schwierigen Bearbeitung des Materials und vielleicht auch wegen mangelnder Anregung aus den Kreisen der Mikroskopiker. Auf eine Anfrage bei der Firma E. Leïtz wurde mir mitgeteilt, daß man dort auch schon eine solche Konstruktion in Erwägung gezogen habe, daß weder die rechnerischen noch die technischen Schwierigkeiten besonders groß seien und daß nur die Frage der Wirtschaftlichkeit es bisher verhindert habe, daß man der Ausführung näher getreten sei.

Für den Fabrikanten mag diese Frage ausschlaggebend sein, für den Bakteriologen aber bedeutet eine Leistungssteigerung des Mikroskops auf das vierfache einen so großen Fortschritt, daß es bedauerlich wäre, wenn durch die sicherlich hohen, aber doch keineswegs unerschwinglichen Kosten dieser Neukonstruktion der Forschung ein wichtiges Hilfsmittel vorenthalten würde.

Literatur.

1) Szegvari, A., Ueber die ultramikroskopische Untersuchung linearer Elemente. (Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 112. 1924. H. 3/4.) — 2) Frosch, Der Erreger der Maul- und Klauenseuche. (Berl. tierärztl. Woch. Jg. 40. 1924. Nr. 27.)

Inhalt.

Adachi, A., Das morphologische und biologische Verhalten der Diphtheriebakterien in Mischkulturen, S. 30.

Alivisatos, G. P., Ueber einen mit Formol bereiteten Typhusimpfstoff, S. 20.

Bitter, Ludwig, u. **Buchholz, Leo,** Ueber Milchsäurestreptokokken und Pneumokokken, S. 38.

Fernbach, Hans, u. **Hässler, Erich,** Zur Frage der Antikörperbildung in der Haut, S. 81.

Gutstein, M., Das Ektoplasma der Bakterien. III. und IV. Mitteilung: Morphologie und Aufbau des Ektoplasmas der grampositiven Bakterien. Zugleich ein Beitrag zur Theorie der Beizenfärbung. Mit 1 Tafel, S. 1.

Herrmann, Otto, Virulenz des Speichels des lyssakranken Menschen und Einfluß anderer Krankheiten auf den Verlauf der Tollwut, S. 67.

Herrmann, Otto, Experimentelle und natürliche Lyssa recurrens. S. 69.

Kovács, Nikolaus, Zur Technik der subduralen Impfung mit Organemulsionen. Mit 1 Abbildung im Text, S. 89.

Lode, Alois, Zur Züchtung der Anaëroben. Mit 1 Abbildung im Text. S. 91.

Schmidt, Hans. Die Steigerung der Antikörperbildung durch intravenöse Manganchlorür-Einspritzungen. Mit 1 Abbildung im Text, S. 74.

Standfuß, R., u. **Schnauder, Fr.**, Das Kaltauszugverfahren bei der Milzbrandpräzipitation, S. 61.

Troester, C., Ein Vorschlag zur Steigegerung der Leistung des Mikroskops, S. 94.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5336

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 95. Heft 2/4.

Ausgegeben am 8. Juni 1925.

Nachdruck verboten.

Der Bakteriophage, ein lebender Organismus[1]).

[Institut für tropische Hygiene in Leiden (Direktor: Prof. P. C. Flu).]

Von Dr. **C. J. Schuurman**, Leiden.

Will man die Frage, ob der Bakteriophage ein lebender Organismus ist oder nicht, beantworten, so hat man zunächst festzustellen, welche Eigenschaften man für die lebende Natur als charakteristisch erachtet. Es ist bekannt, daß neben der d'Herelleschen Theorie andere bestehen, die z. B. die unendliche Ueberimpfbarkeit des Bakteriophagen, aus der man auf ein Vervielfältigungsvermögen desselben schließen müßte, in anderer Weise zu erklären suchen und die theoretisch nicht a priori verworfen werden können. Ferner ist es möglich, die Erscheinung des Anpassungsvermögens an kolloidale Lösungen, in welchen geeignete Puffer vorhanden sind, nachzuahmen. Der Umstand, daß schließlich jedes Mineral imstande ist, in heterogenem Milieu seine ursprünglichen Eigenschaften zu behalten, weist darauf hin, daß auch Autonomie kein absolutes Lebenskennzeichen ist. Sobald aber diese Dreiheit von Eigenschaften einem und demselben Organismus eigen ist, ist die lebende Natur desselben eine unleugbare Tatsache.

In einer Reihe von Untersuchungen, die in kurzem ausführlicher in Form einer Dissertation erscheinen werden, habe ich verfolgt, wie sich der Bakteriophage in bezug auf diese Dreiheit verhält.

A. Das Anpassungsvermögen des Bakteriophagen.

d'Herelle ließ einen Bakteriophagen eine Bakterienemulsion in 50proz. Glyzerinbouillon auflösen und darauf die erhaltene Bakteriophagenkultur stehen, bis sie durch die langsame Verdunstung zu wasserfreiem Glyzerin geworden war. Während nun der Bakteriophage binnen 24 Std. in reinem Glyzerin unwirksam wird, war er nun aktiv geblieben. Abgesehen aber von dem Umstande, daß im ersten Fall Bouillonbestandteile den Bakteriophagen noch beschützen und das durch Verdunstung erhaltene Produkt also durchaus nicht dem reinen Glyzerin gleich ist, könnte das Wirksambleiben des Bakteriophagen auch wohl auf einer passiven Veränderung seiner Substanz beruhen, ebensogut wie ein durch Kälte erstarrtes Lebewesen (Pflanze oder Tier) durch langsames Auftauen noch lebend bleiben kann. Dasselbe gilt für die Mitteilung Bablets. Mehr Beachtung verdient die Mitteilung Janzens und Wolffs, daß ein Bakteriophage nach 24 Std. in Chinosol $^1/_{2000}$ inaktiviert war, aber sich nach 9 Tagen wieder lebend erwies. Dann aber, wenn hier keine Unterschiede in der Technik im Spiele gewesen sind, konnte bezweifelt werden, ob sich der Bakteriophage im

1) Kurzer Abriß aus: „De bacteriophaag, een ultramicrobe". Verlag S. C. van Doesburgh, Leiden.

Ruhezustande, also aller Wahrscheinlichkeit nach ohne aktiven Stoffwechselprozeß, hier wohl aktiv angepaßt hatte. Schon kurze Zeit nach der Entdeckung d'Herelles war es Bordet und Ciuca (1) gelungen, einen Coli-Bakteriophagen nacheinander auf Shiga, His, Flexner, Strong, Typhus, Paratyphus A und B aktiv zu machen, was d'Herelle natürlich als Beweis für sein Anpassungsvermögen auffaßte. Es wäre indessen auch möglich, daß ein verschiedenen Bakterienarten gemeinschaftlicher Faktor die Ursache war, daß der Bakteriophage von der einen Art auf die andere übergeimpft werden konnte. Dies wird jedoch um so unwahrscheinlicher, je weniger diese Arten untereinander verwandt sind. Diese Annahme geht von der Voraussetzung aus, daß die Bakterien stets wieder einen solchen Bakteriophagen reproduzieren wie denjenigen, der zuerst auf sie eingewirkt hat. Diese Annahme ist richtig, denn laut den nachstehend zu beschreibenden Versuchen behält der Bakteriophage unter diesen Umständen seine Individualität. Eine Konsequenz hiervon ist aber außerdem, daß diese Individualitäten dann gleich sein müssen, was aber keineswegs der Fall ist. Seiffert hat dieses Dilemma auch gefühlt, aber glaubt, daß zwei verschiedene Bakteriophagen bei Passagen auf derselben Bakterienart gleich werden, und umgekehrt derselbe Bakteriophage bei Passagen auf verschiedenen Arten verschieden. Meine Versuche, ebenso wie diejenigen anderer Untersucher, beweisen einwandfrei, daß dies nicht zutrifft.

Bail und andere stellen sich auf die Seite der anderen Partei. Nach Bail beruht Polyphagie auf der Anwesenheit gleicher Gruppen in verschiedenen Bakterienarten. Nach ihm sind dies die Chromosome, nach anderen gemeinschaftliche Nahrungsrezeptoren, nach wieder anderen gemeinschaftliche Fermente. Aber der Umstand, daß nicht zwei Bakteriophagen gleich sind, könnte dann nur noch dadurch erklärt werden, daß den Bakterien das unglaubliche Vermögen zuerkannt wird, alle möglichen Bakteriophagen, jeden entsprechend ihrer eigenen Individualität, genau reproduzieren zu können. Man muß dann wohl Hypothese auf Hypothese stapeln. Otto und Munter (2) formulieren dies so, daß offenbar alle Bakteriophagen eine gemeinschaftliche und eine spezifische Gruppe enthalten. Mit der ersteren reizen sie die Bakterien zur Bildung eines Bakteriophagen, dessen Bau durch die 2. Gruppe bedingt ist. Dies wäre nun wohl noch möglich, wenn man die Bakterien Reihen von Generationen hindurch daran gewöhnen könnte, einen bestimmten Bakteriophagen zu bilden, aber in den gebräuchlichen Passagen werden immer wieder frische Bakterien benutzt, so daß eine Anpassung derselben ausgeschlossen ist.

Wenn wir alle diese Auffassungen konsequent verfolgen, muß die Ursache der Polpyhagie in dem Bakteriophagen selbst gesucht werden. Nun können Valenzen bisweilen latent bestehen, z. B. nach Einwirkug von Hitze oder Antisepticis, so daß eine eventuelle Ausbreitung der Polyvalenz auch einem Manifestwerden schon bestehender Valenzen zugeschrieben werden kann. Da jedoch alle Bakteriophagen verschieden sind und höchstens in einige Gruppen eingeteilt werden können, beruhen die bestehenden Unterschiede doch auf erworbenen hereditären Variationen, und der Bakteriophag besitzt also die Fähigkeit, sich dem Parsitismus einer anderen Bakterienart anzupassen.

Ich glaube dann auch feststellen zu dürfen, daß gemeinschaftliche Gruppen in den Bakterienkörpern keine Rolle spielen können beim Be-

stehen der Polyvalenz. Denn diese erstreckt sich nicht über Bakterienarten, sondern über bestimmte Bakterienstämme.

Wenn ich im Nachstehenden von einer Ausbreitung der Polyvalenz eines Typhusbakteriophagen in der Richtung der Pasteurella-Gruppe und von einer Einschränkung derselben bei einem Shiga-Bakteriophagen durch Passagen auf einem nicht verwandten Bakterienstamm Mitteilung machen werde, so glaube ich, diese beiden Veränderungen dem Anpassungsvermögen zuschreiben zu müssen, wofür ich noch andere Beweise anführen zu können glaube.

Was die von Mc Kinley (3) angestellten Versuche betrifft, dem es gelang, verschiedene Kokken durch einen virulenten Shiga-Bakteriophagen nach nur 5 Passagen in Glukose-Blutbouillon auflösen zu lassen, so muß ich bemerken, daß mir eine derartig überraschende Anpassung an eine nicht verwandte Bakterienart in der großen Anzahl der gleich zu beschreibenden Versuche nicht gelungen ist. Auch vermochte ich einen Shiga-Bakteriophagen nicht virulent zu machen für Staphylokokken und umgekehrt. Möglicherweise spielt die Glukose-Blutbouillon eine Rolle bei seinem positiven Resultat, vielleicht muß auch das Ganze anders erklärt werden. Die Umkehrbarkeit der Anpassung ist indessen wohl eine wichtige Stütze zu seinen Gunsten.

Ganz anderer Art sind die Experimente, die Prausnitz anstellte (4). Bei völliger Neutralisierung durch Antibakteriophagensera erwiesen sich einige Bakteriophagen noch stets als wirksam. In einer neuen Passage zeigten sich diese etwas resistenter gegen ein Antiserum. Indem Prausnitz nun bei Anwesenheit desselben eine Reihe Passagen vornahm, erhielt er schließlich eine Bakteriophagenkultur, die serumfest war, welchen Umstand er mit Recht als ein wertvolles Argument zugunsten der d'Herelleschen Theorie anführt. Ein ähnlicher Versuch gelang auch da Costa Cruz (5) und Bruynoghe u. Wagemans (6), aber nicht Seiser (7) und Doerr. Letzterer erachtete die von Prausnitz angestellten Versuche als nicht überzeugend, weil gerade durch die Passagen die Virulenz zugenommen haben könnte und die Möglichkeit, durch ein Antiserum neutralisiert zu werden, noch besonders von der Virulenz des Bakteriophagen abhängig ist; aber ein ebenfalls durch Passagen virulent gemachter Kontrollbakteriophag von Prausnitz wurde nicht als resistent befunden. In einer späteren, von Prausnitz und Firle (8) gemachten Mitteilung berichten diese, daß der Bakteriophage immer wieder sensible Varianten bildete und daher absolute Serumfestheit sogar in $1^1/_2$ Jahren nicht erzielt werden konnte. Mit Recht fassen diese Forscher denn auch die Variabilität als einen zweiten Beweis für die lebende Natur des Bakteriophagen auf.

Wenn ein Bakteriophage während der Passagen an Virulenz zunimmt, muß dies auch dem Anpassungsvermögen zugeschrieben werden auf Grund des zu Anfang dargelegten Gedankenganges. Nun ist es eine allgemeine Erfahrungstatsache, daß eine solche Virulenzerhöhung bisweilen nicht gelingt. Ausgehend von den Untersuchungen einiger Forscher, u. a. denjenigen von Gratia und Arkwright, aus welchen sich gezeigt hat, daß die Bakterien aus derselben Kultur sich individuell gegenüber dem Bakteriophagen sehr verschieden verhalten, habe ich die folgende Methode erdacht, die Virulenzerhöhung, die auf andere Weise nicht gelingen wollte, dennoch herbeizuführen:

Die Bakterienkultur wurde in isolierten Kolonien auf Agar ausgesät. 10 Kolonien wurden jede gesondert auf ihre Empfindlichkeit gegen den Bakteriophagen hin untersucht. Von jeder wurde dann 1 Oese in 2 Bouillonröhrchen von 2 ccm geimpft und gleichzeitig wieder eine neue Generation isolierter Kolonien angelegt, indem zugleich ein wenig in das Kondenswasser eines Agarröhrchens geimpft wurde. Das erste der beiden Bouillonröhrchen ward mit dem Bakteriophagen beimpft, und von beiden wurden auf 1proz. Agar (PH 8,2) (welches Medium für Bakteriophagenexperimente sich viel besser eignet als 3proz. Agar PH 7,5) Kontrollkulturen angelegt. Auf diese Weise konnte untersucht werden, welche der Kolonien die größte Empfindlichkeit gegen den Bakteriophagen besaß, und mit dieser wurde eine erneute Passage ausgeführt, Diese Anpassungsmethode „via Kolonien des geringsten Widerstandes" hat mir wiederholt überraschende Resultate ergeben, woraus erhellte, daß, wenn der Bakteriophag seine Virulenz in bezug auf eine der Kolonien erhöht hatte, er dann gegenüber dem ganzen Stamm virulent geworden war. Dies ist gleichzeitig ein Beweis, daß die Bakterien sich aktiv gegen den Bakteriophagen verteidigen. Auch hier zeigt sich also wieder, daß der Bakteriophage sich ebenso gegenüber Bakterien verhält, wie diese gegenüber höheren Organismen.

Asheshov (9) glaubt, einen Bakteriophagen an saures Medium (PH 6,6) angepaßt zu haben, in welchem ein anderer Bakteriophage schon sofort Lysis herbeiführen konnte, was er für eine individuelle Eigentümlichkeit jenes speziellen Bakteriophagen hielt. Da ich auch selbst hierüber Versuche anstellte, komme ich gleich hierauf zurück.

Prausnitz und Firle haben, ermutigt durch das mit Antisera erzielte Resultat, versucht, den Bakteriophagen an Antiseptika zu gewöhnen (8). Mit Tetralin gelang dies nicht, wohl aber mit Phenol und Sublimat. Auch hierbei erwiesen sich die Bakteriophagen verschieden in ihrer Resistenz; jedesmal wurden wieder empfindliche Varietäten gebildet; mit anderen Worten die soeben genannte Variabilität trat auch hier deutlich zutage. Es zeigte sich, daß ein Bakteriophage, der nach 2tägigem Verbleiben in 1,5proz. Phenol bei Zimmertemperatur definitiv unwirksam geworden war, nach 22 Passagen in steigenden Phenolkonzentrationen nur 18 Proz. von seiner Wirksamkeit hierin einbüßte und sogar in 1,7proz. Phenol noch in einem Teil der Variationen aktiv geblieben war. Ein ähnliches Resultat erzielte er mit dem Anpassungsvermögen des Bakteriophagen an Sublimat und Chloramin.

3 der bisher genannten Arten von Anpassung habe ich selbst in einer großen Versuchsreihe untersucht.

I. Reihe. Untersuchung über das Anpassungsvermögen des Bakteriophagen an heterologe Bakterienarten

a) durch Beimpfen frischen Bakteriophagenfiltrates mit einer heterologen Bakterienart;

b) mittels multipler Kulturen (d'Herelle);

c) mit der Methode der „Kolonien des geringsten Widerstandes".

Bei Methode a) wurde jedesmal ein wenig frische Bouillon hinzugesetzt und wurden Passagen ausgeführt. Bei Methode b) wurden Bouillonröhrchen und -kölbchen zugleich mit 2 oder 3 Bakterienarten

und mit einem auf einen der Stämme wirksamen Bakteriophagen beimpft. Auch hierin wurden Passagen ausgeführt.

A. Versuche, einen Cholerabakteriophagen an einen Coli-Stamm, Dysent. Y, Shiga-Kruse u. a. nicht verwandte Arten anzupassen, hatten mit keiner der 3 Methoden (nach 7 Passagen, zwischen denen die Kulturen bisweilen einfach 10 Tage im Brutschrank gelassen wurden, während bei andern die Passagen jeden Tag erfolgten), irgendwelches Resultat.

B. Versuche, einen Typhusbakteriophagen an Cholera 107 und Pseudodysenteriestamm 83 anzupassen, gelangen nicht mit Methode a) und b), auch nicht mit gewöhnlichen Passagen, aber mit Methode c) war ich imstande, die unverkennbar schon bestehende, sehr schwache Virulenz gegen Stamm 83 zu erhöhen.

C. Auch ein Staphylokokkenbakteriophage, der während 3 Monaten in einem zugeschmolzenen Röhrchen, in welchem sich außerdem Coli 145 befand, aufbewahrt wurde, und der danach vor und nach Filtration auf Agar untersucht ward, zeigte keine Coli-Valenz. Auch durch Passagen konnte diese nicht erzeugt werden.

D. Anpassungsversuche mit einem Shiga-Bakteriophagen:

1) Versuche, einen Shiga-Bakteriophagen an Cholera und Vibrio Metchnikoff-Stämme anzupassen, blieben ohne Erfolg. Als dieser Bakteriophage jedoch in einem gleich zu beschreibenden Experiment nach 10 Passagen auf einen nicht verwandten Bakterienstamm 91 und darauf nach 10 Passagen auf Coli 135 seine Valenz für Typhus 142 verloren hatte, gelang es wieder mittels Methode b), das 10. Coli-Filtrat wieder aktiv zu machen gegen Typhus 142. Man beachte aber, daß hier die Typhusvalenz auch ursprünglich schon bestand.

2) Während es erst nicht gelang, irgendwelche Wirksamkeit dieses Bakteriophagen auf Coli 108 und 109 nachzuweisen, zeigte sich, daß nach 9tägigem Kontakt in Bouillonkultur bei 37° eine Valenz gegen Stamm 109 erzielt wurde.

3) Stamm 91 ist ein Bakterienstamm, der sich serologisch und bezüglich der Kultureigenschaften nicht mit Shiga-Dysenterie verwandt erweist, dessen Identität ich aber nicht festzustellen vermochte. Nach 75 Passagen durch diesen Stamm zeigte der Shiga-Bakteriophage keine Aktivität mehr in bezug auf Shiga 138. Durch Passagen ließ sich diese verlorene Valenz nicht mehr wiederherstellen. Daß jedoch diese Valenz nur latent geworden war, zeigte sich mir bei Anwendung von Methode c) (siehe unten) und der folgenden Methode d): fünf Flaschen Bouillon (Ph 8,2) wurden mit je 1 ccm des 77. Filtrats des Shiga-Bakteriophagen (91 F 77) und 1 Tropfen Shiga 138-Emulsion beimpft. Nach 10tägigem Stehen bei 37° wurde aus jeder Flasche ein Teil filtriert und jedes Filtrat untersucht, ob es wieder für Stamm 138 virulent geworden war. Das Resultat war negativ, aber als ich die Flaschen noch 1 Monat länger im Brutschrank hatte stehen lassen, zeigte sich, daß die ursprüngliche Shiga-Valenz wieder zurückgekehrt war.

E. In Zusammenhang mit diesem letzten positiven Resultat beimpfte ich eine Reihe Bouillonflaschen mit allerlei Kombinationen von Bakteriophagen mit heterologen Bakterienarten. Diese blieben 1 Monat bei 37° stehen, worauf aus jeder Flasche 5 ccm filtriert und untersucht wurden. Das Resultat war für alle Kombinationen negativ. Nach 2 Monaten wurde dasselbe Verfahren noch einmal wiederholt, aber von

einem unbegrenzten Anpassungsvermögen des Bakteriophagen war nichts zu bemerken.

F. Spezielle Besprechung von Methode c).

Ein Typhusbakteriophage besaß eine schwache Virulenz gegen Coli 108. Ich suchte diese durch Passagen zu verstärken, aber ohne Erfolg.

1. Passage: Bouillonkult. + Bakterioph. ebenso trübe wie Kult. allein. Agarkontrolle?
2. „ : „ + „ < „ „ „ „ „ ++
3. „ : „ + „ ebenso „ „ „ „ „ +
4. „ : „ + „ „ „ „ „ „ +?

(+ = positive Bakteriophagenwirkung, berechnet nach der Anzahl Löcher).

Ich wandte mich dann der Methode der „multiplen Kulturen" zu und ließ so den Bakteriophagen auf gleichzeitige Kulturen von Typhus 142 und Coli 108 einwirken. Während der ersten 3 Passagen nahm die Virulenz des Bakteriophagen zu, nach der 4. sank sie wieder. Offenbar war Coli 108 imstande, entweder dem Bakteriophagen Widerstand zu leisten, oder ihn zu vernichten. Als ich auf diese Weise keinen Erfolg hatte, säte ich Coli 108 in isolierten Kolonien aus. 8 derselben wurden auf ihre Empfindlichkeit auf den Typhusbakteriophagen hin untersucht. Von diesen erwiesen sich Nr. 1, 3, 4 und 5 in der Tat als sensibel, aber 2, 6, 7 und 8 wurden durch den Bakteriophagen nicht aufgelöst. Am empfindlichsten von allen war Nr. 3. Das Filtrat hiervon war sofort virulent für den ganzen Stamm 108, mit dem von nun an Passagen leicht gelangen. Indem also während einer Passage die resistenten und für den Bakteriophagen gefährlichen Varietäten ausgeschaltet wurden, hatte der Bakteriophage Gelegenheit gehabt, seine Virulenz zu erhöhen.

Noch ein anderes Beispiel, in dem mir diese Anpassungsmethode die Fortsetzung meiner Versuche ermöglichte, ist folgendes:

Nachdem der Shiga-Bakteriophag während 75 Passagen auf Stamm 91 gezüchtet war, untersuchte ich, ob er seine ursprüngliche Shiga-Valenz noch behalten hatte. Nach der 72. Passage war diese noch, obwohl sehr schwach, nachweisbar. Jetzt ließ sich aber, wenigstens gegenüber Shiga 138, keine Wirkung mehr nachweisen, auch nicht nach wiederholten Passagen.

In derselben Weise, wie oben, wurden 8 Kolonien von Stamm 138 auf ihre Empfindlichkeit gegen 91 F 75 hin untersucht. Auch hier sieht man wieder deutlich, daß das Fehlen bestimmter hemmender Varietäten wieder ein schnelles Steigen der früher vorhandenen Virulenz bewirkte.

Bouillonröhrchen beimpft mit:			wovon auf Agar ausgestrichen:
Kol. Nr. 1	= Kontr., nämlich Tr.	++++ [1])	Agar 1 einige „Flatterformen"
„ „ 2	= „ „ „	++++	„ 2 „ Löcher
„ „ 3	< „ „ „	++	„ 3 Schwammkultur (sehr viel Löcher)
„ „ 4	= „ „ „	++++	„ 4 einige Löcher und „Flatterformen"
„ „ 5	< „ „ „	+++	„ 5 einige große Löcher
„ „ 6	> „ „ „	+++++	„ 6 viele sehr kleine Löcher
„ „ 7	= „ „ „	++++	„ 7 einige Löcher
„ „ 8	= „ „ „	++++	„ 8 viele kleine Löcher.

Filtriert wurden die Bouillonröhrchen Nr. 3 und 5 (F. Kol. 3, F. Kol. 5).

Agar Shiga 138 + F. Kol. 3: +++ (Schwammkultur)

„ „ 138 + F. Kol. 5: ++++ (fast steril).

1) Gibt den Grad der Trübung an.

So zeigte sich also, daß die Shiga-Valenz noch latent vorhanden war und wieder reaktiviert werden konnte.

Aber konnte denn mit dieser Methode nicht jeder Bakteriophage jeder Bakterienart angepaßt werden? Wenn dies nämlich so wäre, würde die Shiga-Valenz im letzten Versuche nicht wieder zurückgekehrt, sondern aufs neue erworben sein! In Verbindung mit der Frage der Unität oder Pluralität von Bakteriophagen war es erforderlich, dies näher zu untersuchen. In einer großen Anzahl von Experimenten wurde versucht, den Cholerabakteriophagen mit Methode c einer großen Anzahl verschiedener Bakterienstämme anzupassen, aber ohne irgendwelches Resultat.

Auf Grund dieser Versuche komme ich zu dem Schluß, daß latente oder schwache Virulenzen mit dieser Methode und anderen zwar verstärkt werden können, daß es aber nicht gelingt, einem Bakteriophagen eine Valenz zu verleihen, die er nicht schon besitzt. Dies beweist aufs neue, daß die Ursache der Polyphagie in dem Bakteriophagen und nicht in den Bakterien gesucht werden muß, und ist zugleich eine Stütze für die Auffassung, daß es verschiedene Arten von Bakteriophagen gibt. Daß jedoch eine allmähliche Änderung der Eigenschaften des Bakteriophagen noch stets stattfinden kann, ist nicht nur von andern Seiten konstatiert, sondern hoffe ich gleich auch selbst zu demonstrieren.

II. Reihe. Untersuchung über das Anpassungsvermögen des Bakteriophagen an einen höheren Säuregrad, bezw. Sinken des Ph.

Der Umstand, daß sich Bakterien (z. B. Dysenteriebazillen) bei 37° in Bouillon mit Ph 6,5 noch sehr gut vermehren können, aber der Bakteriophage sich offenbar in äußerst ungünstiger Verfassung befindet, ist bereits ein schwerwiegendes Argument gegen die Auffassung, daß die Bakterien den Bakteriophagen erzeugen. Aber noch viel deutlicher würde sich die Autonomie des Bakteriophagen manifestieren, wenn er sich fähig erweisen würde, sich diesem ungünstigen Faktor anzupassen, unabhängig von irgendwelchem Bakterieneinfluß, und zwar um so mehr, da wahrscheinlich ein Uebermaß von H-Ionen direkt auf die enge Beziehung einwirkt, die zwischen dem Bakteriophagen und dem ihn umgebenden Medium besteht.

Nachdem die Virulenz eines Bakteriophagen gegen Flexner 7 bis zum Maximum gesteigert war, wurden 2 Reihen Passagen begonnen, die 1. in normaler Bouillon (Titer 10^{-9}), die 2. in Bouillon, deren Ph von 8,2 jedesmal um 0,05 abnahm (kolorimetrisch bestimmt nach Clark). Nach der 24. Passage entwickelte sich schon sehr schnell eine Sekundärkultur, was ich einer Verlangsamung der Vermehrung der Bakteriophagen zuschreibe. Daher ließ ich die Passagen nun bei 22° verlaufen, mit dem großen Erfolg, daß sie nun bis Ph 6,8 möglich waren. Hierauf ließ ich sie einfach 2 Tage bei 16° stehen.

Es zeigte sich nun, daß der normale Bakteriophage von Ph 6,7 dem an Säure gewöhnten Bakteriophagen gegenüber im Nachteile war. Eine Gewöhnung der Bakterien war ausgeschlossen. Die letzte Passage, die noch möglich war, verlief in Bouillon Ph 5,7, in welcher die Bakterien noch als eine zarte Flocke auf dem Boden wuchsen. Der

normale Bakteriophage ergab keine, der angepaßte aber noch totale Lysis.

Darauf führte ich mit diesem angepaßten Bakteriophagen folgende Reihe Passagen in Bouillon PH 6 bei allmählich steigender Temperatur bis 37° aus. Der Titer stieg während dieser Reihe noch und auch bei 37° ergab dieser Bakteriophag noch totale Auflösung der Flexner-Kultur. Der normale Bakteriophage zeigte sich nach parallelen Passagen in Bouillon PH 8,2 nicht irgendwelcher Lysis der Kultur bei 22° bei PH 6 fähig und vermehrte sich dabei auch nicht.

Ich meine also, daß sich somit in überzeugender Weise gezeigt hat, daß der Bakteriophage das Vermögen besitzt, sich allmählich an eine höhere H-Ionenkonzentration zu gewöhnen und auch an die bei niedrigem PH sonst schädliche Temperatur von 37° C.

III. Reihe. Untersuchung über das Anpassungsvermögen des Bakteriophagen an die schädliche Wirkung von Chinosol.

Hierbei wurde in der Weise verfahren, daß jedesmal zwischen 2 Bouillonpassagen ein Aufenthalt von 24 Std. in stets stärkeren Chinosolkonzentrationen eingeschaltet wurde.

Ich hatte nun in einer andern Versuchsreihe bereits gefunden, daß in physiologischer Kochsalzlösung, die 40 Proz. Bouillon enthält, bei einer Chinosolkonzentration $^1/_{500}$ die Virulenz und bei $^1/_{400}$ auch die Anzahl der Bakteriophagen abzunehmen anfängt. War der Bouillongehalt 10 Proz., dann sank der Titer schon von 10^{-8} bis 10^{-3} nach 24std. Verbleib in Chinosol $^1/_{490}$, während die Virulenz nur noch sehr gering war (kleine Plages, keine Lysis in Bouillon).

Nachdem der Bakteriophage 24 Std. lang bei 37° in physiol. Salzlösung mit 40proz. Bouillon und Chinosol $^1/_{500}$ belassen worden war, wurde seine Wirksamkeit auf Agar und in Bouillon untersucht, und zwar 1. direkt, 2. nach 100facher und 3. nach 5000facher Verdünnung neben den nötigen Kontrollen. Die letzte Verdünnung war hinreichend, alle Chinosolwirkung auszuschalten. Das Resultat der aufeinanderfolgenden Passagen via Chinosol $^1/_{500}$, $^1/_{499}$, $^1/_{498}$, $^1/_{497}$ usw. war, daß der Titer ungeschwächt auf 10^{-8} blieb, bis Chinosol $^1/_{492}$. Darauf war der Titer während 3 Passagen etwas niedriger, wonach er wieder stieg. Gerade in jenem Gebiet lag die Inaktivierungskonzentration für den normalen Bakteriophagen. Es war also ein chinosolfester Bakteriophagenstamm entstanden, mit dem ich denn auch meine Passagen weiter fortsetzen konnte bis Chinosol $^1/_{472}$. Der Titer war noch immer 10^{-8}, während der normale Bakteriophage schon durch 12stdg. Aufenthalt in Chinosol $^1/_{490}$ derartig in der Virulenz zurückgegangen war, daß er sich nicht mehr fähig erwies, eine Bouillonkultur aufzulösen.

Das Anpassungsvermögen wurde noch um so deutlicher, als ich stets weniger Bouillon hinzusetzte und die Chinosolkonzentration auf $^1/_{472}$ hielt.

Endresultat:

Normaler Bakteriophage. Nach 24stünd. Verbleib in Chinosol $^1/_{472}$ (10proz. Bouillon). Sinken des Titers von 10^{-8}—10^{-3}. Außerdem starker Virulenzverlust.

Derselbe Bakteriophage. Nach 24stünd. Verbleib in Chinosol $^1/_{472}$.

Nach der 24. Passage über Chinosol. Virulenz noch maximal (10proz. Bouillon). Titer konstant auf 10^{-8}.

Durch vorübergehende Schließung des Laboratoriums war ich verhindert, diesen Versuch noch weiter fortzusetzen, um zu ermitteln, bei welcher Konzentration die Abschwächung dann wohl beginnen werde, denn ich hatte die Grenze offenbar noch längst nicht erreicht. Es war jedoch hinreichend deutlich, daß der Bakteriophage sich auch an Chinosol angepaßt hatte.

Da sich auf diese Weise mit Sicherheit gezeigt hat, daß der Bakteriophage sich an Phenol, Sublimat, Antisera, Chinosol und eine erhöhte H-Ionenkonzentration anzupassen vermag, und seine Virulenz auf dem Wege über empfindliche Versuchsbakterien steigern kann, wird man zugestehen müssen, daß diejenigen, die den Bakteriophagen nicht als einen Ultramikroben betrachten, doch vergeblich Analogien und Hypothesen zu Hilfe rufen werden, um dieses Anpassungsvermögen zu erklären.

B. Der Bakteriophage als autonomes Wesen.

Um zu ermitteln, ob der Bakteriophage unbeschadet der Faktoren, die ihn fortwährend zu ändern geeignet sind, doch imstande ist, seine Individualität zu behaupten, habe ich untersucht, ob die Polyvalenz bei Passagen bei jeder der zugehörigen sensiblen Bakterienarten gleich bleibt, auch wenn diese letzteren untereinander relativ wenig verwandt sind.

d'Herelle schreibt schon, daß ein Staphylokokkenbakteriophage nach 100 Passagen noch pathogen war für einen Dysenteriestamm, und daß ein Dysenteriebakteriophage nach 1200 Passagen seine ursprünglichen Valenzen gegen Coli und Typhus noch behalten hatte (10). Bruynoghe (11), der die Nichtspezifität der Bakteriophagen als eine wesentliche Stütze für d'Herelles Auffassung betrachtet, weist darauf hin, daß man ein derartiges Verhalten von einem Ferment nicht zu erwarten braucht. Gratia und de Namur (12) berichten, daß 2 verschiedene Staphylokokkenbakteriophagen bei gekreuzten Passagen ihre individuellen Eigenschaften behielten. Janzen und Wolff erhielten gleiche Resultate und fanden, daß die Polyvalenz sich noch ausbreiten kann und bisweilen auch Valenzen verlorengehen können (13, 14, 15). Tschang kow Ngen und Wagemans (16) berichten ebenfalls über die Erhaltung der Polyvalenz. Seiffert (17) dagegen meint, daß jeder Bakteriophage seine Eigenschaften demjenigen Bakterienstamm verdankt, auf welchem er gezüchtet ist, obschon er selbst Ausnahmen hiervon beobachtet hat.

Ein Bakteriophage Maitlands, virulent gegen Shiga und Paratyphus B, hatte nach einer Reihe von Passagen durch jeden dieser Stämme seine Bivalenz behalten. Auch Matsumoto (18) tritt für Autonomie seiner „Teilbakteriophagen" ein. Nach Jonesco Mihaiesti (19) war ein Typhus-Shiga-Bakteriophag nach 20 Passagen durch Shiga nicht mehr aktiv auf Typhus, nach 20 Passagen auf Typhus noch schwach aktiv auf Shiga. Auch Bails Untersuchungen basieren auf dem Konstantbleiben einer Reihe von Eigenschaften der „Teilbakteriophagen". Asheshov (20) mischte 2 Bakteriophagen und glaubte, sie nachher durch die Größe ihrer Löcher wieder voneinander unterscheiden zu können. Soweit diese beiden Bakteriophagen eine verschiedene Virulenz besaßen, kann dies möglich gewesen sein; als Artkennzeichen kann jedoch die Größe der Löcher nicht dienen. Der

namentlich in leicht saurem Medium gut aktive Bakteriophage Asheshovs behielt diese Eigenschaft bei Passagen durch andere Bakterien. Hieran konnte er diesen Bakteriophagen erkennen (20).

Alle diese Daten stimmen in dem Punkte der Autonomie des Bakteriophagen ziemlich überein. Fügt man sie zu den anderen, schon wiederholt genannten Daten, die zeigen, daß alle Bakteriophagen verschieden sind, was sowohl bei Aufbewahren eines Filtrats (21) als bei Untersuchung nach ihrem Verhalten gegenüber Säuren (22), Antiseptika, Hitze und anderen schädlichen Faktoren deutlich zutage tritt, wie auch in dem verschiedenen Bild der Polyvalenzen und der Spezifität der neutralisierenden Antisera, so zeigt sich, daß die Konzeption jedes Bakteriophagen als ein autonomes Individuum auf einem geschlossenen Zyklus von Daten beruht. Durch die folgenden Experimente suchte ich mich von der Wahrheit des Vorstehenden zu überzeugen:

Von einem Typhus- und einem Shiga-Bakteriophagen wurde das vollständige Bild der Polyvalenz festgestellt, indem ihre Wirksamkeit auf 125 verschiedene Bakterienstämme untersucht wurde.

Der Shiga-Bakteriophage war aktiv auf 32 Stämmen, unter welchen 7 verschiedene Arten waren. Von diesen war Stamm 91, eine Art abweichender Paracolibazillus[1]), der mit Shiga 138 am wenigsten verwandte.

Der Typhusbakteriophage war aktiv auf 57 Stämmen, unter welchen sich 12 verschiedene Arten befanden. Von diesen wurde Coli 108 für die Versuchsreihe ausgewählt.

I. Die Erhaltung der Polyvalenz des Shigabakteriophagen.

A. Erst war es zweifelhaft, ob Stamm 91 für diesen Bakteriophagen wohl empfindlich sei; aber nach 2 Passagen begann die Virulenz schnell zuzunehmen. Nach 37 Passagen fing die Shiga-Valenz an, schwächer zu werden; sie ließ sich indessen nach 50 Passagen noch deutlich nachweisen (30 kleine Plages auf einem Agarröhrchen); m. a. W. durch Nichtverwendung war die Aktivität dieser Valenz zwar stark geschwächt, aber noch nicht verloren. Wie war es nun um das Bild der vollständigen Polyvalenz bestellt? Dies war noch genau dasselbe geblieben. Es schien, als ob die Polyvalenz gegenüber einigen Stämmen sogar zugenommen hatte; aber dies muß einer inzwischen eingeführten verbesserten Technik zugeschrieben werden. Desto mehr Wert erhielt der Rückgang der Virulenz gegenüber der Dysenteriegruppe, und besonders merkwürdig war der Umstand, daß insbesondere für den ursprünglich empfindlichsten Zuchtstamm 138 die Virulenz abgenommen hatte, viel weniger für die anderen Shiga-Stämme. Einige schwache Valenzen (u. a. gegen Typhus) waren nicht mehr nachweisbar. Schließlich war eine neue Valenz aufgetreten, nämlich für 2 Pseudotuberkulosestämme. Ich setzte nun die Passagen noch fort: Nach 70 Passagen auf Stamm 91 zeigte der Shiga-Bakteriophage noch 19 sehr kleine Löcher auf einer Agarkultur von Shiga 138. Auflösung einer Bouillonkultur fand nicht mehr statt. Nach 73 Passagen ließen sich noch 4, nach 75 Passagen keine Löcher mehr nachweisen. Es schien also, als ob endlich die Shiga-Valenz verlorengegangen war.

1) Der jedoch aus keinem Zucker Gas bildete.

Ich suchte diese Valenz mit den verschiedenen oben besprochenen Methoden zu reaktivieren, was mir nicht mit anderen Methoden, aber wohl mit der Anpassungsmethode über „Kolonien des geringsten Widerstandes" gelang, wie ich schon oben beschrieben habe. Die Valenz war also nur latent gewesen, gleichsam atrophiert durch Nichtverwendung.

Daß endlich dieser Bakteriophage noch immer derselbe war wie zu Anfang, bewies eine erneute Untersuchung des vollständigen Bildes der Polyvalenz mit 91 F 78 auf alle 125 Stämme. Daraus ging hervor, daß die Valenzen für die ganze Dysenteriegruppe erheblich zurückgegangen, und diejenigen für eine Anzahl anderer Stämme, für welche die Valenz schon schwach war, latent geworden waren; aber das Gesamtbild war noch immer dasselbe. Positiv war die Wirkung noch auf 34 Stämme, unter welchen 6 verschiedene Arten waren (dieselben Stämme wie zu Anfang).

Diese Versuchsreihe bewies, daß der Bakteriophage ein autonomer Organismus ist. Wäre er ein Produkt der Bakterien, dann hätte eine Anzahl Valenzen plötzlich verschwinden müssen und wäre nicht eine vereinzelte nur allmählich erloschen.

B. Nach 10 Passagen auf Stamm 91 erwies sich der Shigabakteriophage u. a. noch stets aktiv auf Coli 135, womit dann weitere 10 Passagen leicht gelangen. Auf diese Weise wollte ich den Bakteriophagen über verschiedene Bakterienstämme gleichsam eine Rundreise machen lassen. Das 10. Filtrat auf Coli 135 (135 F 10) hatte indessen die Typhusvalenz, die dieser Bakteriophage ursprünglich besaß, verloren. Durch die Methode der „multiplen Kultur" konnte ich aber diese latent gewordene Valenz in 5 Passagen leicht wieder reaktivieren, worauf ich noch 12 Passagen auf den Typhusstamm 142 folgen ließ. Auf diese Weise hatte sich dieser Shiga-Bakteriophage in 10 Passagen auf Stamm 91, 10 Passagen auf Coli 135, 5 Passagen auf gemischte Coli-Typhuskultur, und 12 Passagen auf Typhus 142 vermehrt, und wurde nun auf die Erhaltung seiner Shiga-Valenz hin untersucht. Es zeigte sich, daß der Shiga-Bakteriophage nach diesem Umwege über verschiedene Bakterienarten nach 37 Passagen noch seine Shiga-Valenz behalten hatte.

C. Endlich ließ ich diesen Shiga-Bakteriophagen nach 50 Passagen auf Stamm 91 noch 10 Passagen auf den Pseudotuberkulostamm 90 machen, worauf noch einmal das Bild der Polyvalenz untersucht wurde. Dieses war auch jetzt wieder in der Hauptsache konstant geblieben. Nur eine Gärtner-Valenz war latent geworden.

II. Die Erhaltung der Polyvalenz des Typhusbakteriophagen.

Wenn die ausgedehnte Polyvalenz dieses Bakteriophagen auf einer Mischung beruht, würde das Bild derselben sich bei Passagen auf einen nicht verwandten Bakterienstamm völlig verändern müssen. Ich wählte nun Coli 108, weil nach Janzen und Wolff die Coli- und Typhusvalenz nicht gut zu vereinigen sind und dies sogar eine Erklärung bieten soll für das schnelle Verschwinden des Typhusbakteriophagen aus den Fäzes eines Typhuspatienten. Nach 51 Passagen auf Coli 108 wurde die Untersuchung wieder ebenso wie zuvor auf alle 125 Stämme ausgedehnt, mit dem Ergebnis, daß eine zweifelhafte Pasteurella-

valenz stärker geworden war, ebenso die Virulenz gegen Dys. Strong 48. 2 schwache Valenzen waren verloren gegangen. Nunmehr war der Bakteriophage also noch aktiv auf 56 Stämme, unter welchen sich 12 verschiedene Arten befanden. Die Kombination aller dieser Valenzen zeigte sich also an **einen** Bakteriophagenstamm gebunden und erwies sich als eine inhärente, hereditäre Eigenschaft, die viele Generationen hindurch in heterogenem Medium konstant bleibt, was die Grundzüge betrifft, während an der Peripherie eine Variabilität zum Ausdruck kommt, wie man sie allein bei einem lebenden Organismus erwarten kann.

Zusammenfassung.

Daß der Bakteriophage sich während der Passagen stark vermehrt, ist allgemein bekannt; daß er sich schädlichen Faktoren anzupassen vermag, hat sich aus den vorstehenden Untersuchungen deutlich gezeigt; daß er unbeschadet dieses Anpassungsvermögens seine Individualität 300—400 Generationen hindurch in heterogenem Medium im wesentlichen zu behaupten weiß, ist, wie ich glaube, in der zweiten Versuchsreihe hinreichend bewiesen; daß endlich der Bakteriophage diejenige Variabilität, welche die Folge des Besitzes der 3 Lebenskennzeichen ist, auch deutlich zeigt, ist die Probe aufs Exempel, daß man in dem Bakteriophagen nichts anderes sehen kann, als einen Ultramikroben, einen Parasiten der Bakterien.

Literatur.

1) J. Bordet et M. Ciuca, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 84. 1921. p. 278. — 2) Otto u. Munter, Ergebn. der hyg. Bakt., Immunf. u. exp. Ther. Bd. 6. 1923. — 3) Mc Kinley, Journ. of Labor. and Clin. Med. Vol. 8. 1923. p. 311. — 4) K. Prausnitz, Klin. Woch. 1922. S. 1639. — 5) J. da Costa Cruz, Brazil Medico. T. 2. 1922. p. 131. — 6) R. Bruynoghe et J. Wagemans, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 88. 1923. p. 968. — 7) A. Seiser, Arch. f. Hyg. Bd. 92. 1923. S. 189. — 8) C. Prausnitz u. E. Firle, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. S. 148. — 9) Y. Asheshov, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 87. 1922. p. 1341. — 10) F. d'Herelle, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 90. 1924. p. 481. — 11) R. Bruynoghe, Ibid. T. 85. 1921. p. 258. — 12) Gratia et de Namur, Ibid. T. 87. 1922. p. 364. — 13) J. Janzen en K. Wolff, Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam. Bd. 31. 1922. Nr. 2 u. 3. — 14) Dies., Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1922. II. Hälfte. Nr. 17. — 15) Dies., Ibid. Bd. 67. 1923. II. S. 147. — 16) Tchang Kow Ngen et J. Wagemans, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 87. 1922. p. 1253. — 17) W. Seiffert, Ztschr. f. Hyg. Bd. 98. 1922. S. 482. — 18) T. Matsumoto, Ztschr. f. Immunforsch. Bd. 41. 1924. S. 1. — 19) Jon. Mihaiesti, Journ. exp. Med. Vol. 40. 1924. — 20) Y. Asheshov, Journ. Infect. Dis. Vol. 34. 1924. p. 536. — 21) Ders., Compt. Rend. Soc. Biol. T. 89. 1923. p. 118. — 22) Fr. Reichert, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. 1924. S. 235.

Nachdruck verboten.

A Study of the Characters of Primary Importance in the Differentiation of the Micrococci.

By **G. J. Hucker.**
New York Agricultural Experiment Station, Geneva, N. Y.

The mass-forming cocci commonly known as the micrococci or the staphylococci have been studied by various investigators in an effort to find some character which might definitely separate the saprophytic members of the group from the forms generally found associated with various infections. Regardless of the relationships of the members of the group many bacteriologists have felt that the so-called parasitic Staphylococcus should be distinct from the more or less saprophytic Micrococcus. In many taxonomic studies dealing with this group the object has been to find some general character which would once and for all separate the free-living form occurring under saprophytic conditions from the closely related species which have become permanently or temporarily adapted to a parasitic and in some cases, pathogenic life. In such cases it has usually been assumed that there are no „border-line cultures" which may if the proper conditions are present, become parasites even if normally they are saprophytes, and vice versa. The investigators who are chiefly interested in public health bacteriology have many times failed to appreciate that organisms which are normally more or less infectious in nature may also occur as normal inhabitants of air, milk, soil, etc.. and play some part in the normal changes which take place in these habitats. On the other hand, laboratory workers interested in industrial and agricultural bacteriology have usually considered only the organisms with which they have been thrown in contact and look upon the so-called „pathogenic types" as foreign to their field of bacteriology. It must not be forgotten that even though the science of bacteriology is very naturally divided along the lines mentioned, it does not necessarily follow that the natural grouping of bacteria follows a similar course. It is evident that a study of the group of micrococci should include strains from all sources, and divisions should be sought which will divide the group, if it should be divided, into closely related and natural sub-groups.

Assuming the Micrcoccus-Staphylococcus group to be made up of a series of closely related species, a large number of strains representing this group were collected and studied to find if possible whether there were any natural lines of division which might separate the group into two distinct genera. These representative cultures were studied from the standpoint of chromogeneses, habitat, nitrate reduction, gelatin liquefaction, action upon milk, ability to utilize ammonium salts and pure amino acids as the only source of nitrogen, Gram reaction, oxygen requirements, diastatic action, fermentation of sugars, ammonia production from peptone and nitrates, nature of growth on agar slants and in broth, maximum H-ion concentration in dextrose broth, nature of cells, and ability to hemolyze blood. A survey of the results indicated that gelatin liquefaction, nitrate reduction, habitat, action upon

milk, chromogenesis and ability to utilize ammonium salts as an only source of nitrogen were the most important characters for use in the classification of this group. The results of these tests and their correlation with each other and with various other tests are outlined below.

Characters applicable for the classification of bacteria must be selected with as much care as similar characters pertaining to the systematic arrangement of the bigher plants. In either case the characters useful in classification are not necessarily the most important physiological characteristics of the organisms. In studying the biology and physiology of a group of bacteria it is necessary that we learn their nitrogen and carbohydrate metabolism as well as other general physiological reactions in order to know their relation to their surroundings in nature; but in the selection of characters for classification natural lines of division are indicated by correlation between different characters, and by constancy.

For the differentiation of larger groups or genera it is essential that two or more correlated characters be found and these characters must show in themselves a certain amount of constancy. Characters useful in the separation of species must show constancy at least and a correlation between characters is hightly desirable. The classification of bacteria has presented problems which are different from those found in the classification of higher plants. In the latter case a large number of morphological as well as physiological characters are available, and it has been the practice to require constancy in all cases and also correlation between characters in describing species as well as genera. In studying bacteria, however, the small number of available characters has led systematists to describe species and even in some cases larger groups on the basis of one constant character.

In assuming that such relationships between characters should be found before groups should be divided into genera, representative cultures of the Micrococci[1]) have been studied to find some division line based upon a constant correlation of two or more characters by which the group could be split into two or more genera. The general characteristics of the group of Micrococci have also been determined.

Origin and source of cultures.

The cultures used in the following investigations were collected from various sources with the thought kept in mind that a representative series should be collected. Three hundred and sixteen cultures were used, 105 of which were secured from John Hopkins University; 79 from Parke, Davis and Company; 9 from Lederle Antitoxin Laboratories; 7 from the Kral collection in Vienna; 9 from the National Collection of Type Cultures of the Lister Institute, London; 15 from the American Museum of Natural History Collection; 34 from various laboratories throughout the United States and Europe: and 58 were freshly isolated.

Of the 194 cultures isolated from human and mammalian bodies, 64 were endoparasitic and obtained from pathologic lesions of various kinds, and 123 were found on the surface of similar bodies and 7 were

1) This term is used throughout in a broad sense to include Staphylococci and Rhodococci.

isolated from freshly drawn milk. While it may be assumed that the cultures isolated from lesions were generally pathogenic, the organisms isolated were not definitely determined to be the etiological factor causing the lesion.

The 86 cultures isolated from saprophytic sources were derived as follows: 49 from milk and from dairy utensils, 8 from water, 11 from feces, 5 from soil, 3 from leather, 2 from the surface of ripe tomatoes, 3 from cheese, 3 from air, 1 from the surface of a potato, and 1 from putrid meat. The remaining 36 strains were received with only a name attached and no information could be secured as to their source, but in a large number of cases they probably represent non-parasitic types.

Data.

Chromogenesis. The presence or absence of pigment in coccus cultures has for some time been used as a diagnostic feature in separating genera, species, or varieties, depending upon the investigator's conception of the importance of this character. It has been generally adopted as it is an easy character to determine and one that has been considered constant by many investigators. Its significance has also been emphasized because of its possible relation to certain other characters of the group. For example, it is commonly believed that there is a close correlation between pigment production and habitat, Gram staining reactions, etc., and such correlations have been extensively employed in the classifacation of this group.

In 1884, Rosenbach, and in 1885, Passet, studying cocci from infected wounds, pointed out that the presence or absence of an orange pigment was of sufficient importance to aid in designating different species of Staphylococci. Passet, and also Fischer and Levy (1893) believed that the more lightly colored or colorless form were more generally associated with disease, while Rosenbach was of the opinion that the pigmented types were the more virulent. Noguchi (1911) studied the relationship of virulence to chromogenesis as did Nicolle and Césari (1914), and the results of both of these investigators indicate that the non-chromogenic forms are non-virulent, while Dudgeon and Sargent (1906) reported a number of cases in which white cocci were isolated from healing wounds and orange strains from infected wounds. The Winslows (1908) also shared the view that the pigmented forms were the most virulent, and most workers familiar with the group have agreed with this idea.

The use of chromogenesis in classification was quickly adopted by Flügge (1886), following the work of Rosenbach and Passet, and he used pigment production as a character in separating both genera and species of cocci. Later the Winslows (1906, 1908), Kligler (1913), Winslow, Rothberg and Parsons (1920), the Committee of the Society of American Bacteriologists (Winslow et al, 1917, 1920), and others have based their systematic arrangement of the mass-forming cocci on the relation of pigment production to habitat, especially in describing genera.

However, opinions as to the importance of chromogenesis have differed and not all workers have agreed that pigment production is of primary and fundamental importance. Neisser and Lipstein (1903) thought that white and chromogenic strains have all other characters in common, and these workers have suggested that all white forms have been derived from pigmented ones, due to the action of some external factor which has caused the organism to lose its power of pigment production. They have also pointed out that various factors such as too strong light, too long cultivation in complete darkness, as well as the presence of certain chemicals, may appreciably affect the amount of color production. Longard (1886) also believed that orange and white forms from whatever source were similar, and Dudgeon (1908) thought all Staphylococci belonged to one variable species regardless of chromogenesis. Neumann (1897) likewise records the appearance of apparently new strains of an entirely diffe-

rent color in various parts of a sealed stab culture which had been allowed to grow for some time.

Various observations have been reported from time to time concerning the possible relation of the colorless to the colored forms. Rodet and Courmont (1890) stated that they had observed over long periods of time certain white strains which gradually acquired the power to produce a typical orange pigment. Lannelongue and Achard (1890) disagreed with this statement and believed that there were other factors which were definitely correlated with color, such as virulence, size of cells, etc., indicating that white and orange types were different, and questioned the validity of Rodet and Courmont's observations and the purity of their cultures.

Of the 316 representative strains of mass-forming cocci studied in the present investigation, 110 produced a yellow, 4 a red, and 50 an orange pigment, while 152 failed to show any pigment production at any stage of their growth, when grown at an optimum temperature, reaction, etc. Of the latter, 103 were of the transparent white types, while the remainder gave a chalky opaque growth.

The outstanding fact which is noted at once is the relatively small number of orange and red strains and the large number of white and orange strains. This may be due, in part, to the fact that the orange and red cultures more frequently represent selected cultures from stock collections, while a larger number of white and yellow forms were freshly isolated. However, so few red and orange types were found in the isolations that the author believes that the yellow and white forms predominate in nature. Another thing which affects the number of orange cultures is difficulty in distinguishing between the orange and yellow cultures, and also the fact that in many laboratories all pigmented mass-forming cocci, other than red, are called aureus even in some cases where the pigment is light yellow. In many cases, also the yellow strains show a distinct buff color at certain stages of their growth which, if only one observation is taken, may cause the particular culture in question to be classed with the orange group, whereas its natural pigment may be yellow. The cause of such a development appears to be unknown, but may be closely linked with the age and the temperature of growth. To tabulate a culture definitely as orange, the transfer should show a distinct buff to definite orange pigment which usually develops after 24 to 48 hours incubation, the yellow cultures becoming pigmented generally previous to this time.

Color charts have been advocated by several observers interested in the use of chromogenesis as a diagnostic feature in classification and, if such charts could be accurately used, it might be possible to separate the yellow-orange group into three sub-groups, viz., (a) those which are constantly and distinctly yellow, (b) a variable group, and (c) a group which develops an orange color. Such an arrangement seems at present impossible, however, as a comparison of a bacterial growth with a color standard is not satisfactory when fine distinctions are to be made. A division of the mass-forming cocci into the large sub-groups of yellow, orange and red is much to be preferred to a number of smaller groups divided by finer differences in tint or shade. Most pigmented cultures will vary in shade within certain limits. Thus differences in amount and degree of color are not of as great importance as the presence or absence of color.

As a control on the rough grouping of the cultures according to pigment production on an agar slant, each of the cultures were dried on glazed white paper and compared with both Winslows color

chart for the cocci and Ridgeways color standards. Such observations were made several times during the course of the work and at various ages of the cultures. In comparing the grouping according to chromogenesis as observed on the agar slant with that as determined by drying on paper, only a few discrepancies were noted. Certain cultures which appeared as orange strains on the surface of agar gave a definite yellow color when dried and in a few instances the reverse was true. However, when the entire series of cultures as studied were divided on the basis of color production and the differentiation determined upon broad lines, the groups so formed appeared relatively constant and subject only to slight variations. Such slight variations may be expected in any character.

A rather close relationship has been claimed by many systematists between chromogenesis and the reaction to the Gram stain. Generally speaking, the saprophytic types (red, yellow and a few white) are supposed to be Gram negative, while the more parasitic forms are regarded as being Gram positive. This was found to be true in the present work in only a small percentage of the cases. As an examination of the results will show that the four cultures of red cocci were Gram negative or variable with a tendency to negative; while the yellow group, commonly associated with the red-pigment-producing types because of their similar habitat were obout equally Gram positive and Gram negative. The orange and white groups, however, are generally positive with a relatively large number of variable strains. In the white group the transparent types are especially constant in being Gram positive, while the „chalky" types tend to be more variable. These results indicate that only a few of the micrococci are constantly Gram negative, while a larger number are more or less variable with a tendency especially in the orange and white types, to be Gram positive.

A similar correlation was found to exist between habitat and pigment production .The red types were all from definitely known or probably saprophytic habitats, a condition which agrees with the general conception of this group, while the yellow group appears about evenly distributed between a parasitic and saprophytic origin. In the orange and white groups parasites are predominant.

Some points of interest were found in comparing the relationship between the reduction of nitrates and chromogenesis. The red cocci generally, reduced nitrates. The yellow forms appear about equally divided between types which attack nitrate and those which fail to reduce while the white types, especially the more truly parasitic strains, tend to reduce nitrates more frequently than the yellow and orange groups. It would be easy to divide the micrococci into two clearly definite groups on the basis of the nitrate reduction test, but the two groups so formed would each contain white, yellow, orange and red types and also both parasites and saphrophytes. In other words, there is no correlation between these important characters.

Only general statements can be made in regard to the fermentation of the sugars—lactose, dextrose, and sucrose. The red and yellow strains tend to be less active than the white and orange groups, as a smaller number of cultures from the latter group attacked the test sugars used. In the case of the white group, the chalky types are less active than the transparent forms. This may be due to the fact that the former group represents a large number of free-living

organisms which in many cases are usually less active when tested against the various sugars. The same relationship is also shown in the fermentation of glycerin and mannite, substances which are not listed on the table. The chalky white types attack these particular substances in only a few instances.

The relationship of chromogenesis to the assimilation of amino and ammonia nitrogen is striking. The red strains produced an abundant growth when either an amino acid (sodium asparaginate) or ammonium salts were furnished as the only source of nitrogen. The yellow group generally utilize ammonia nitrogen, but a large majority fail to produce a growth when amino nitrogen was the only nitrogen furnished. Of 110 yellow cultures studied, 29 failed to utilize amino nitrogen, while of the same cultures 75 produced a growth when nitrogen was furnished in the form of ammonium salts. The orange group reacted about equally to these tests, while among the white types it was noted that a large majority of the transparent strains failed to grow either in the presence of amino or ammonia nitrogen.

The action of the cultures upon milk in relation to chromogenesis shows cartain minor correlations, althought the only correlation referred to here is the fact that a large number of the yellow and transparent white types produce varying amounts of peptonization in milk. In some cases peptonization is slight, but in some cases the curd was completely digested.

Many laboratory workers who handle large numbers of coccus cultures feel that there is a distinct difference between the white strains which produce a characteristic transparent scanty growth on the surface of agar slants and the strains which grow with an opaque, chalky appearance. This conception is well supported by the present observations.

The cultures producing a chalky growth tended to react as do free-living strains generally, while the general characters of the transparent types were like those of cultures of parasitic origin. This difference is not an absolute one, however, and this character can be used only to estimate roughly the probable source and characteristics of the culture. The length of time which a culture has been grown on an artificial medium, together with the composition of the medium, may play an important part in determining the nature of the white growth, and reliance should not be placed too strongly upon this character until more is known regarding the conditions which control its development.

In summing up the relationship between chromogenesis and various other characters of this group, it should be noted that in only a few instances were correlations found. It appears that the red cocci are the least active from the standpoint of sugar fermentation, gelatin liquefaction, etc., while the transparent white types are the most active of the cultures under observation. A partial correlation was found between habitat and pigment production and in a limited way, there was a relationship between the production of color and Gram staining properties, nitrate reduction, and the ability to utilize various forms of nitrogen.

As to the nature of the pigment, it is generally agreed from the work of Schrötter (1895), Sullivan (1905), and others that they are lipochromes, or lipoxanthines according to Schrötter.

Neisser (1912) states that Beijerinck believed micrococcus pigment to be an excretory product and that Zopf found coccus pigments to spot paper and give an acrolein test. A study of the pigment showed it to be practically insoluble in 95 per cent alcohol, ether, chloroform, and water and only slightly soluble in benzol when allowed to act for several days.

When examined with a spectroscope, the red pigment solutions showed a large absorption band in the red and purple portion of the spectrum, while the yellow and orange solutions gave faint bands in the red, yellow, and purple segments of the spectrum.

Repetitions of the above experiments, using heavy saline suspension of the organisms from which to extract the pigment, gave negative results with all of the solvents used.

Of the factors controlling the production of pigment little appears to be known. Beck and Schultz (1896) reported the effect of X-rays and also monochromatic light upon pigment production, while Lubinski (1894) believed that color production was closely linked with certain physiological activities, and pointed out that growth under anaërobic conditions and subjection to an atmosphere of hydrogen and carbon dioxide intensifies the pigment. Kolle and Otto (1902) thought that temperature must play an important role as they observed that cultures subjected to 85° C lost their power to produce color, while animal passage and too long cultivation on artificial media produced the same effect.

In an extended investigation of the general nature of bacterial pigments Sullivan (1905) pointed out that several factors may be involved. Reaction of media, temperature of growth, and presence of albuminoids appeared to be among the more important, while several minor factors had an influence, depending upon the type and condition of the culture.

Further data was secured by observing the effect of reaction of the medium. It is generally believed that a greater amount of color is produced on an alkaline medium and that the presence of appreciable amounts of acid will retard pigment production. A representative number of the cultures (3 yellow and 2 orange strains) were selected and grown for three generations upon media ranging in acidity from pH 2,0 to pH 10,0. (In the case of the media of the pH 2,0 reaction the agar failed to solidify). Although the reaction appeared to play an important part in the time of the initial appearance of the pigment, the amount and nature of the color was not affected by the change in H-ion concentration. During the three generations, the color remained about normal varying only within the limits generally observed upon media of the same reaction. While it has been suggested that a number of transfers over a long period of time may show a relation between reaction of media and color production, the present results do not give any foundation for such a belief.

The temperature of incubation appears to play an important part in the control of pigment production as well as the temperature at which the culture is normally held as a stock. The orange cultures appeared to form pigment well at 30 to 37° C, while the red types produce pigment very slowly at this temperature. Room temperature in most cases appears to be the best adapted for color production. The stock cultures held at room temperatures and then transferred

retain their pigment-producing properties much longer than cultures held at ice-chest temperatures and then transferred. Pigmented strains, when carried for several generations under chilled conditions, lose their color; but regain it, if the culture has not been chilled too long, by holding the culture at room temperature followed by several rapid transfers. Transfers of several hundred cultures of micrococci held at both room and ice-chest temperatures have indicated that the temperatures at which the stock cultures are stored plays an important part in the control of color formation in cultures on artificial media.

Rapid transfer of many cultures appeared to affect the intensity of the pigment produced, while in other strains a few rapid transfers would cause the organism practically to lose its color. Of the temperature as well as length of time of the holding of stock culture any one type of pigment and this phenomenon and, as stated above, the temperature as well as length of time holding of stock culture may play a part.

Large amounts of water of condensation usually hindered the production of color. Occasionally, white strains transferred from tubes which contained a large amount of water of condensation to relatively dry agar would immediately show a heavy pigment production. Repeated transfers on a medium with abundant water of condensation would cause the culture to lose its pigment-producing power. Konradi (1904) noted practically similar results, but found that animal passage restored the orange color to the culture which he used.

Various albuminoids and also organic acids (tartaric, acetic etc.) were added to the media to note any effect on color production, but the results were uniformly negative. In several instances the cultures grew upon a medium composed of agar, tap water, and dextrose with normal color produced.

From the above observations it seems evident that pigment production by the mass-forming cocci is a very important character for use in classification. However, due to its general lack of correlation with other characters it does not appear that the group should be subdivided into genera with differences in chromogenesis as the chief diagnostic feature. On the other hand, it seems that pigment production is sufficiently constant to warrant its use as a character of importance in differentiating species and when so used should be interpreted along broad lines rather than to attempt to make fine distinctions in shades of color.

Habitat. — A natural system of classification must be based upon the evolutionary development of a group and the history of this development can be partially interpreted from the habitat of the organisms. Thus, while micrococci do not appear to be abundant organisms in salt and fresh water, and soil, yet certain types of these organisms have been described from these habitats. It is natural to assume that these types are the most primitive or generalized types to be found in the group and that they represent types that appeared early in the geologic development of the earth. The micrococci which appear to occur most abundantly, however, are those associated with the skin, skin glands and pus formation of warm blooded animals. This being the case, it is natural to think of the abundant micrococcus flora of milk, dairy products and utensils as being largely

a secondary development from these more or less parasitic types. All of the types strictly associated with warm blooded animals and secretions from their skin glands, such as milk, must be regarded as of comparatively recent origin from the geologic standpoint and they should also be the more highly specialized types.

However, it must not be forgotten that species of animals or plants of quite different origins, which occupy the same environment may show the same general characters and it may not be impossible that part at least of the dairy products and utensil flora may be more directly derived from soil or water forms. Under these conditions, it is not surprising that it is frequently difficult, if not impossible, to determine whether individual species should be classed as primarily saprophytic or primarily parasitic. None of the parasites are so specialized that they are difficult to grow on ordinary laboratory media, a thing which would lead one to expect that even the most strictly parasitic types will grow in nature under saprophytic conditions and even, play their part in the natural decompositions and other changes that take place in these habitats.

In spite of this, habitat has been considered as a basis for subdividing the group of micrococci and is evident from the large amount of work completed in which the object has been to obtain a test which would easily differentiate the parasitic and pathogenic types from the less harmful ones. Andrewes and Gorden (1905) believed that this could be done on the basis of fermentation of mannite, while Neisser and Wechsberg (1901, Kolle and Otto (1902), Pröscher (1903), Klopstock and Bockenheimer (1904), VanDurme (1903), Veiele (104), Kutscher and Konrich (1904), Fraenkel and Baumann (1905), Flügge (1910), Bruck and Hidaka (1911), Geisse (1913) etc., believed that various serological tests were applicable for such a separation.

As early as 1888, Ullmann believed that habitat might serve as a basis for differentiating the micrococci and isolated cultures from air, mouth secretions of healthy persons etc., and decided that the pathogenic forms were different from the types found under saprophytic conditions. Concornotti (1899), however, found upon a repetition of the above work, that the typical air forms were Staphylococcus aureus and S. albus and no different from the micrococci found on or in the human body.

A partial correlation between habitat and other characters of the micrococci does exist and this is quite striking in some instances. In general, the cultures from parasitic sources tend to be Gram positive, while the saprophytes are, in a greater percentage of the cases, Gram negative. Of the 6 cultures of known origin which were persistently Gram negative, all were from free-living sources. Of the 187 parasites, 121 were Gram positive or varied with such tendencies, and only 47 varied with a tendency to be Gram negative, while 19 appeared so variable as not to be included in either group.

Reduction of Nitrates. — The reduction of nitrates as a test for classifying the cocci gives very clear cut, concise results and if this test could be applied as a means of classifying the group under observation more definite divisions could be made than in any other way. The agar slant method as described by Conn and Breed

(1919) invariably gives clear cut positive or negative results and such results are, in a large majority of the cases constant.

Several repetitions of this test using nitrate broth in place of the nitrate-agar slants as described above gave results in which very few discrepancies were found. However, a study of the correlation between these results and those secured from other tests does not indicate that nitrate reduction is a character closely related with any of the other cultural characteristics of the group. The 272 cultures which have the power to reduce nitrates probably belong to several sub-groups. In practically every case groups formed on the basis of nitrate reduction can be more or less equally divided when considered in the light of the various other tests. The 54 non-reducers are, however, a more homogeneous group than the reducers. This appears more clearly when a further division of the non-reducers is made upon the basis of chromogenesis and liquefaction of gelatin. The groups thus formed appear to be more closely related than similar groups formed among the nitrate reducers.

The relation between ammonia production from nitrates and nitrate reduction is interesting. The possibility of nitrate reduction, as indicated by the production of nitrates, being covered up by the production of ammonia directly from nitrates or from the nitrites as rapidly as they are formed has been pointed out in another paper (Hucker and Wall, 1922). Striking examples of this type were found in twelve cases where ammonia was produced from nitrates, while the nitrite test was negative.

Many other investigators have considered nitrate reduction as of primary importance in the separation of the species in this group. The Winslows (1908) used this particular test, together with certain others, to differentiate their species, while Gordon (1905, 1906), in addition to applying nitrate reduction as a diagnostic feature of his group of cocci, believed that nitrate reduction was a character common to all white micrococci.

Liquefaction of Gelatin. — Liquefaction of gelatin has been used as a diagnostic character in separating the cocci in many cases and in some instances has been used as the basis for the division of large groups. Chester (1901), Flügge (1886) and Migula (1900) in assembling the various groups of micrococci used this character as a point of departure, while in the hands of other systematists it has proved helpful in classifying the streptococci. Kruse (1896) claimed, however, that liquefaction of gelatin could not be relied upon as cultures carried for some time on artificial media lost their liquefying power. Lannelonge and Achard (1890) thought that the rapidity of the liquefaction was important and pointed out that in many cases Staphylococcus albus and S. aureus could be separated on this point.

The rate of gelatin liquefaction has also been used by others in separating the so-called S. epidermidis albus of Welch (1891) from the closely related S. albus Rosenbach. Kruse (1896) reported that repeated cultivations under anaërobic conditions caused the micrococci practically to lose their power of gelatin liquefaction.

A comparatively large number of the cultures under observation possessed the ability to attack gelatin. The Winslows (1908) noted that all but 128 out of 500 strains (including streptococci) liquefied

gelatin while in the present survey all but 56 out of 316 attacked gelatin.

Many worker have used the type of gelatin liquefaction, whether craterform, saccate etc., as a basis for differentiating certain groups of organisms. Such application of this test to the mass-forming cocci is not warranted from the results of this investigation. Although certain strains appeared to produce a more or less constant type of liquefaction, a large number showed variations. Amount of inoculum, temperature of incubation, composition of media, and any factor affecting the rapidity of the growth appeared, in a majority of the cases, to have its effect the type of growth produced.

The time of appearance of the initial liquefaction seems to be independant of the amount of liquefaction. In many cases the strains showing a decided liquefaction before five days, only produced a slight liquefaction, and even when incubated for long periods of time failed to produce greater reactions. On the other hand, many cultures give abundant growth but no liquefaction for 80 days and within 24 hours entirely liquefied the tube. This is not true in all of the cases of slow liquefaction, however, as many of the cultures at the end of long periods of incubation on gelatin produced only very slight traces of liquefaction. In the case of those types which appear to lay dormant for some time and then suddenly attack the medium and rapidly liquefy it, it many be true that during their period of growth certain constituents of the gelatin which are more available to the organisms are used and that when these ingredients are utilized, another part of the gelatin is immediately attacked. As a result of this second attack the gelatine is liquefied. Or the cells may autolyze simultaneously and liberate endoenzymes which attack the gelatin. It is evident that the cultures must be incubated at least 100 days in order to fully determine the liquefying power of the mass-forming cocci.

The organisms possessing the ability to liquefy gelatin have no other characters in common. However, the non-liqufiers when further divided upon the basis of chromogenesis appear to form a more definite group. Failure to attack gelatin appears to be a fundamental character and, due also to its constancy, it appears to furnish a feature which can be used in conjunction with chromogenesis to designate smaller groups or possibly species. The liquefiers, however, appear to be made up of a very heterogenous group of cultures which precludes the use of this character alone as a basis of separation of sub-groups or species.

Action on Milk. — Investigators have differed in many instances as to the diagnostic value of milk in separating the cocci into natural sub-groups. A few workers (Winslows, 1908) with this group have regarded milk as unsatisfactory as it affords only a limited number of tests when used as a medium, viz., change of reaction, coagulation, and decolorization of litmus. However, other observers have reported proteolytic (Gorini, 1910) strains and, in one case, a gasproducing culture (Adametz, 1895) has been described. A French investigator (Marbias, 1919) has made an extensive study of milk reactions among the mass-forming cocci and decided that it serves as an excellent medium with which to differentiate the various groups.

That certain types of the mass-forming cocci have the power to attack milk and produce various amounts of proteolytic action has been shown by Freudenreich and Thöni (1903), Orla-Jensen (1904), Gorini (1910) etc.

In the present survey a large number of peptonizing cocci were found, as 105 of the 316 cultures studied attacked casein and 32 of them were very active and rapidly liquefied the curd. The peptonizing strains appear to have few other characters in common, but it was noted that the non-pigment-producing cultures have a greater tendency to produce this action in milk than do the pigmented forms. The types showing a large amount of peptonization however, generally produced a definite acid reaction.

Only a small number (22) of the cultures produced a rennet curd and this character appears to show promise as a diagnostic feature when used alone in describing sub-groups or species of cocci. Petruschky (1890), Fermi (1890), and Dyar (1895), however, have described alkaline-coagulating types of staphylococci, and this property may be a characteristic feature of a certain type of micrococci. A study of the activities of the organisms from the standpoint of production of acid in milk has produced some interesting results, the most striking of which is the fact that many of the cocci of this group may produce a smooth acid curd in milk very similar to that of Streptococcus lactis (Lister) Löhnis, and in which the litmus is reduced with a red layer appearing at the top. This character in some cases has been accepted as a rough test for the ordinary sour milk organism. Action in such cases appears to be quite rapid and the smooth curd is formed upon 24 hours incubation. Such acid curd production with the reduction of litmus by the cocci indicates that other cultural characters should be used in connection with typical curd production and reduction of litmus to so characterize the common lactic organism generally found in milk, that it can be distinguished from true micrococci.

In general, the parasitic cocci tend to produce acid in milk, but in most instances the amount produced is not sufficient for curdling. This non-curdling group was generally Gram-positive or varied with a tendency to be positive, and a large majority had a tendency to be facultative anaerobes. The curdling cocci, 202 in number, appeared to be the most active sugar fermenters, but as a group, they were widely variable in their habitat and reaction to the Gram stain.

The cultures which were inert in milk, on the other hand, differed from the curdling types in being very inactive in relation to other tests, especially in their lack of ability to ferment sugars and to reduce nitrates. All but 32 of the 114 strains which did not curdle milk failed to reduce nitrates, while a relatively small number produced acid from sugars. In studying the acid production from sugar, one interesting point was noted that of the 38 cultures which failed to produce acid in milk, 35 produced acid in agar slants when lactose was furnished as a source of carbon. This apparent discrepancy was found in repeating the test several times and no explanation could be offered other than a possible simultaneous production of acid and alkali in the milk, whereas in the agar slant the peptone was not as available as the casein and no neutralizing by-products were produced.

Under the same conditions of growth the action of the massforming cocci upon milk appears to be comparatively constant, the widest variation occurring in relation to the amount of acid produced. Action on milk due to its relative constancy may be found useful in separating species if the results are properly interpreted.

Nitrogen Requirements. As nitrogen is one of the essential and important requirements for bacterial growth, it is evident that organisms with such a wide range of habitat as is found among the massforming cocci must have the power to utilize both organic and inorganic forms of nitrogen. The saprophytic mass-forming cocci which are generally found in places where inorganic ammonium salts are also present may be expected to have the power of utilizing such salts as their only source of nitrogen. In order to secure evidence on this particular point, the cultures of this series were tested for their ability to grow on media containing ammonium phosphate and sodium asparaginate as the only sources of nitrogen (Hucker 1924a).

The most striking point noted on studying the availability of ammonium salts as a source of nitrogen is the fact that practically all of mass-forming cocci from parasitic sources failed to grow, while the cultures from saprophytic sources grew on a medium containing ammonium phosphate as the only source of nitrogen. Only 14 of the 187 parasites utilized nitrogen when furnished in the form of ammonium salts, and these 14 strains which failed to grow were all ectoparasites, isolated from the surface of human or animal bodies.

Repeated tests of this character revealed, however, that certain organisms as Micrococcus epidermidis ((Hucker (1924) and other strains which represent border line conditions between the parasitic and saprophytic extremes of the group, evidenced a large variability in their ability to utilize ammonium salts as the only source of nitrogen. This irregularity precludes the possibility of using this test to separate the parasites from the free-living members of the group, but apparently it is a useful method for characterizing certain species of the group such as M. aureus and M. albus. These species invariably fail to utilize nitrogen from such sources while M. casei and M. ureae produce an abundant growth under such conditions.

Conclusions.

A study of the more important characters of the group of irregular mass-forming cocci which might be applicable for subdividing this group indicates that all of the so-called micrococci, staphylococci and rhodococci form one large natural group which undoubtedly is of generic rank. No correlation could be found between characters which would point to natural lines of division nor did the parasitic members of the group show any common characters not found among the more saprophytic types.

Chromogenesis, habitat, nitrate reduction, action on milk, utilization of ammonium salts as the only source of nitrogen, and gelatin liquefaction appear to be the characters which are the most useful in differentiating the species of this group.

Bibliography.

Adametz, L., Ueber Micrococcus Sornthalii. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 1. 1895. S. 465—473.) — Andrewes, F. W., and Gordon, M. H., Report on the biological characters of the staphylococci pyogenic for man. (Supp. 33d Ann. Rpt. Local Gov. Bd., containing Report Med. Off., 1903/4. 1905. p. 543.) — Beck, M., und Schultz, P., Ueber die Einwirkung sog. monochromatischen Lichtes auf die Bakterienentwicklung. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 23. 1896. S. 490—496.) — Bruck, C., und Hidaka, S., Biologische Untersuchungen über die Rolle der Staphylokokken bei Ekzemen. (Arch. f. Derm. u. Syph. Bd. 100. 1911. S. 165. — Chester, F. D., A Manual of Determinative Bacteriology. New York (Macmillan Co.) 1901. 401 pp. — Concornotti, E., Ueber die Häufigkeit der pathogenen Mikroorganismen in der Luft. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 26. 1899. S.492—501.) — Conn, H. J., and Breed, R. S., The use of the nitrate reduction test in characterizing bacteria. New York Agr. Exp. Sta. Tech. Bul. No. 73. 1919. 21 pp. — Dudgeon, L. S., The differentiation of the staphylococci. (Journ. Path. and Bact. Vol. 12. 1908. p. 242—257.) — Dudgeon, L. S., and Sargent, P. W. G., The bacteriology of aseptic wounds. (Lancet. 1906. Vol. II. p. 1335—1341.) — Dyar, H. G., On certain bacteria from the air of New York City. (Ann. New York Acad. of Sci. Vol. 8. 1895. p. 322—380.) — Fermi, C., Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 7. 1890. S. 469—474.) — Fischer, F., und Levy, E., Bakteriologische Befunde bei Osteomyelitis und Periostitis; Vorkommen des Diplococcus pneumoniae Fraenkel und des Streptococcus pyogenes. (Dtsch. Ztschr. f. Chir. Bd. 36. 1893. S. 94—101.) — Flügge, C., Die Mikroorganismen. Leipzig 1886. 692 S. — Ders., Aetiologie und Prophylaxe der Wundinfektionen. (Ztschr. f. ärztl. Fortbild. Bd. 7. 1910. S. 513.) — Fraenkel, C., und Baumann, E. Ueber Hämolysinbildung und Agglutination der Staphylokokken. (Münch. med. Woch. Bd. 52. 1905. S. 937. — Freudenreich, E., und Thöni, J., Ueber die in der normalen Milch vorkommenden Bakterien und ihre Beziehungen zum Käsereifungsprozesse. (Landw. Jahrb. d. Schw. Bd. 17. 1903. S. 232—244. Also Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 10. S. 305—311, 340—349.) — Geiße, A., Die Differenzierung pathogener und saprophytischer Staphylokokken. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 76. 1913. S. 282—306.) — Gordon, M. H., Report of some characters by which various streptococci and staphylococci may be differentiated and identified. (Supp. 33rd Ann. Rpt. Local Gov. Bd., containing Report Med. Off. 1903—04, 1905. p. 388—430.) — Ders., Report on a bacterial test whereby particles shed from the skin may be detected in air. (Supp. 34th Ann. Rpt. Local Gov. Bd., 1906, containing Report Med. Off. 1904—05. p. 387—413.) — Gorini, C., Recherches sur les coccus producteurs d'acide et de présure du fromage. (Rev. Gén. Lait. T. 8. 1910. p. 337—346.) — Hucker, G. J., Studies on the Coccaceae II. A study of the general characters of the micrococci. (N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bul. No. 100. 1924. 83 pp.) — Ders., Studies on the Coccaceae III. The nitrogen metapolism of the micrococci. (N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bul. No. 101. 1924a. 47 pp. — Hucker, G. J., and Wall, W. A., The use of agar stants in detecting ammonia production and its relation to the reduction of nitrates. (Journ. Bact. Vol. 7. 1922. p. 515—518.) — Kligler, I. J., A systematic study of the Coccaceae in the collection of the Mus. of Nat. Hist. (Journ. Inf. Dis. Vol. 12. 1913. p. 432—452.) p. 432—452.) — Klopstock und Bochenheimer, Beitrag zur Agglutination ken. (Arch. f. klin. Chir. Bd. 72. 1904. Heft 2. p. 325.) — Kolle, W., u. Otto, R., Die Differenzierung der Staphylokokken mittels der Agglutination. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 41. 1902. S. 369—379.) — Konrádi, P., Ueber die Lebensdauer path. Bakterien im Wasser. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 36. 1904. S. 203—211.) — Kruse, W., Variabilität der Mikroorganismen. (C. Flügge, Die Mikroorganismen. Bd. 2. 1896. S. 475—493. 3. Aufl. Leipzig 1896.) — Kutscher, K. H., und Konrich, Fr., Untersuchungen über die Beziehungen von Hämolysinbildung und Agglutinabilität der Staphylokokken. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 48. 1904. S. 249.) — Lannelongue and Achard, Sur la distinction des staphylocoques blanc et orangé, d'après la virulence et le pouvoir chromogène. (Compt. rend. Soc. biol. Paris 1890. T. 42. p. 348—352.) — Longard, C., Ueber die Identität der Staphylokokken, welche in der Milch und in akuten Abszessen vorkommen. (Arb. a. d. Path. Inst. zu München. Stuttgart 1886.) — Lubinski. W., Ueber die Anaërobiose bei der Eiterung. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 16. 1894. S. 769—775.) — Marbais, S., Sur la classification des staphylocoque. (Compt. rend. Soc. biol. Paris 1919. T. 82. p. 220—222.) — Migula, W., System der Bakterien. Jena 1900. 1062 S. — Neisser, A., Die Staphylokokken. (Handb. d. pathog. Mikroorganismen. Kolle u. Wassermann, 2. Aufl. Bd. 4. 1912. S. 355

420.) — Neisser, M., und Lipstein, A., Die Staphylokokken. (Handb. der pathogenen Mikroorganismen. Kolle u. Wassermann, Bd. 3. 1903. S. 105.) — Neisser, A., und Wechsberg, F., Ueber das Staphylotoxin. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 36. 1901. S. 299—349.) — Neumann, R., Studien über die Variabilität der Farbstoffbildung bei Micrococcus pyogenes α aureus und einigen anderen Spaltpilzen. (Arch. f. Hyg. Bd. 30. 1897. S. 1—31.) — Nicolle, M., and Césari, E., Études sur les staphylocoques dorés. (Ann. d. l'Inst. Past. T. 28. 1914. p. 219—232.) — Noguchi, H., Ueber die Farbstoffproduktion und Pathogenität der Staphylokokken. (Arch. f. klin. Chir. Bd. 96. 1911. S. 696.) — Orla-Jensen, S., Biologische Studien über den Käsereifungsprozeß unter spezieller Berücksichtigung der flüchtigen Fettsäuren. (Landw. Jahrb. Schw. Bd. 18. 1904. S. 314—400.) — Passet, Ueber Mikroorganismen der eitrigen Zellgewebsentzündung des Menschen. (Fortschr. d. Med. Bd. 33. 1885. S. 33—43, 68—73.) — Petruschky, J., Die Farbenreaktion bakterieller Stoffwechselprodukte auf Lackmus als Beitrag zur Charakteristik und als Mittel zur Unterscheidung von Bakterienarten. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 7. 1890. S. 1—8, 49—53.) — Pröscher, Ueber Antistaphylokokkenserum. (Dtsch. med. Woch. Bd. 29. 1903. S. 195—196.) — Rodet, A., et Courmont, J., Sur les microbes de l'ostéomyélite aiguë juxta-épiphysaire. (Compt. rend. Soc. biol. Paris 1890. T. 42. p. 186.) — Rosenbach, E., Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des Menschen. Wiesbaden 1884. 122 S. — Schrötter, H. v., Vorläufige Mitteilungen über das Pigment von Sarcina aurantica und Staphylococcus pyogenes aureus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 18. 1895. S. 781—782.) — Sullivan, M. X., Synthetic culture media and the biochemistry of bacterial pigments. (Journ. Med. Res. Vol. 14. 1905. (N. S. 9) p. 109—160.) — Ullmann, E., Die Fundorte der Staphylokokken. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 4. 1888. S. 55—66.) — Van Durme, P., Ueber Staphylokokken und Staphylolysin. (Hyg. Rundschau. Bd. 13. 1903. S. 66—68.) — Veiele, F., Die Staphylokokken des chronischen Ekzems. (Münch. med. Woch. Bd. 51. 1904. S. 13.) — Welch, W. H., Conditions underlying the infection of wounds. (Amer. Journ. of Med. Sci. 1891. p. 439.) — Winslow, C.-E. A., and Rogers, Anna, A statistical study of generic characters in the Coccaceae. (Journ. Inf. Dis. Vol. 3. 1906. p. 485—546.) — Winslow, C.-E. A., and Winslow, Anna R., The systematic relationships of the Coccaceae. New York: John Wiley & Sons, 1908. 300 pp. — Winslow, C.-E. A., et al., Preliminary report. The families and genera of bacteria. (Journ. Bact. Vol. 2. 1917. p. 502—566.) — Ders., The families and genera of bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. (Journ. Bact. Vol. 5. 1920. p. 191—229.) — Winslow, C.-E. A., Rothberg, W., and Parsons, E. J., Notes on the classification of the white and orange staphylococci. (Journ. Bact. Vol. 5. 1920. p. 145—167.)

Nachdruck verboten.

Studies on the Serological Relationships of the Species of Micrococci.

[New York Agricultural Experiment Station Geneva, N. Y.]

By **G. J. Hucker.**

Introduction.

During the last decade, serology has played an important part in the differentiation of various closely related organisms. From the standpoint of classification no survey of any group is complete without some knowledge of the serological reactions of ist various members. The importance and application of these results, however, may vary with the particular organisms under study.

It is the purpose of this report dealing with the species of the genus Micrococcus (Hucker 1924) to study the serological relationships of the species as determined by morphological and cultural studies. No attempt will be made to group the micrococci into definite serological groups without reference to other characters, as it is believed that the results of the various serological tests should be dealt with and studied with the same viewpoint as that maintained in considering any other character. Serological tests should be taken into account as the primary basis for separations only when they designate sub-groups containing closely related organisms. In many instances, however, certain strains and varieties can be separated advantageously by serological tests, especially where minor sub-groups are desired in order to make a definite diagnosis.

Previous Studies.

A number of studies of the serological reactions of the micrococci have been presented at various times, either from the standpoint of classification or as a means of determining possible methods of attacking infections which have as their etiological factor certain members of this group.

Landsteiner (1897) was probably the first to produce immune bodies for this group, using rabbits as test animals; while Silvestrini (1898) agglutinated micrococci with human serum from infected patients. Kraus and Löw (1899) in repeating the work of Silvestrini noted that normal human serum may agglutinate various strains of this group in dilutions as high as 1:100. Nicolas and Lesieur (1901) studied certain types with immune sera produced in goats and found that their cultures fell into definite serological groups.

Probably the most extensive study of the serology of this group was that of Neisser and Wechsberg (1901) who showed that pathogenic and saprophytic micrococci might be separated by agglutination and also by the production of hemolysin. Attempts to differentiate micrococci serologically were repeated by Kolle and Otto (1902), Otto (1903), Pröscher (1903, 1903a), Klopstock and Bockenheimer (1904), Fraenkel and Baumann (1905), Walker and Adkinson (1917), Hines (1922), and Jullianelle (1922). From the standpoint of the agglutination test alone all of the above investigators reported distinct differences between the saprophytic forms and those generally associated with pathogenic conditions.

Complement fixation has been used by Ballner and Reitmayr (1907), Altmann and Schultz (1909), and Altmann and Blühdorn (1910) to separate the micrococci into sub-groups and as a means of serologically distinguishing this group from the sarcinae.

Courmont (1894) and Wolf (1896) investigated the development of lytic substances which may be elaborated in the medium, as a basis for a logical separation of the various groups, but their results have been of little aid in the casslification of the group.

Mircoli (1894) and Reichenbach (1897) partially confirmed the above work by noting that immune sera of laboratory animals also evidenced a certain amount of protective action against injections of virulent micrococci.

For a number of years it was believed that the presence or absence of a hemolyzing substance was an accurate indication of the nature of the micrococci, viz., saprophytic or pathogenic. Kraus (1900), Neisser and Wechsberg (1901), Kraus (1902), Kolle and Otto (1902), Lohr (1905), Axenfeld (1907), Mantegazza (1908), Trincas (1908), Jung (1909), Flügge (1910), Bruck and Hidaka (1911), Jullianelle (1922), and others have endeavored to separate the hemolytic types and correlate this character with parasitism. The general conclusion from a study of these excellent contributions must be that in general no relation was found to exist between the power of hemolyzing red blood cells and the virulence of the organisms.

That some factor, other than habitat, is involved in hemolysis has been shown by Orcutt and Howe (1922) who found that micrococci were only hemolytic in the presence of fat or fat-like substances. They concluded that hemolysis was due to the action of a fatty acid or a soap upon the red cells, the fatty acid probably being formed by the action of the lipase liberated by the organisms.

Methods.

The agglutination, agglutination absorption, and complement fixation tests were adopted as the methods which would probably throw the most light on the serological relationships of the species of this group[1]).

Selection of organisms.

Typical cultures of the following 15 species (Hucker 1924) probably the most common of the genus Micrococcus, were selected and immune sera prepared for each: M. albus, M. aureus, M. aurantiacus, M. candidus, M. ureae, M. epidermidis, M. casei, M. tetragenus, M. luteus, M. varians, M. flavus, M. conglomeratus, M. citreus, M. roseus and M. cinnebareus.

Sera were produced of a high titre for each of the above cultures and during the course of the investigation three different rabbits were immunized with each strain.

Data.

Agglutination.

The micrococci have been studied by many investigators from the standpoint of agglutination in an effort to separate this group into sub-groups. As pointed out above, it is doubtful if this test will be in many cases, however, a decided spezificity which probably indicates applicable for dividing the genus into natural sub-groups. It evidences that its chief value lies in separating different species rather than as a character of primary importance in separating the group along broader lines.

It may be noted in Table I that the orange cultures, as represented by M. aureus and M. aurantiacus, are serologically

1) For detailed description of the methods used see N. Y. Agr. Exper. Station Techn. Bull. No. 103.

Table I.
Agglutination of the species of Micrococci.

Antigen	Immune sera against culture number														
	385	270	238	111	401	191	88	484	426	80	196	62	167	213	349
	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution
M. aureus (385)	3000*	400	200	——	0	——	0	——	400	400	0	0	——	—	00
M. aurantiacus (270) . .	400	2000	400	0	0	——	0	——	——	0	0	50	——	0	0
M. albus (238)	100	0	2000	0	400	0	50	0	0	——	0	0	——	50	50
M. casei (111)	0	0	0	2000	0	0	0	——	——	——	0	0	——	0	0
M. candidus (401)	——	——	——	——	1400	0	——	——	——	——	0	0	——	——	——
M. epidermidis (191) . .	0	——	400	0	0	2000	50	0	——	——	0	0	——	0	0
M. ureae (88) .	0	——	100	——	——	100	3000	——	——	——	0	0	——	0	50
M. tetragenus (484)	——	——	400	——	——	0	——	3000	——	——	——	——	——	——	——
M. luteus (426)	400	——	——	——	——	——	——	——	3000	——	——	——	——	——	——
M. varians (80)	50	——	——	——	——	——	50	——	0	3000	200	0	300	50	0
M. flavus (196)	0	——	0	——	——	——	0	——	——	——	2000	0	0	——	0
M. conglomeratus (63) . .	0	——	200	——	——	——	50	——	——	——	0	1400	0	50	0
M. citreus (167)	0	0	0	——	——	——	0	——	——	100	50	0	3000	0	0
M. roseus (213)	0	——	0	——	——	——	0	——	——	——	0	0	——	500	100
M. cinnebareus (349) . .	0	——	0	——	——	——	0	——	——	——	0	50	——	400	2000

* Figures indicate the highest dilution in which a positive agglutination occurred.
0 Indicates no reaction. —— Indicates test not tried.

distinct, as far as agglutination is concerned, from the rest of the group. It is interesting to note that in all cases M. varians, which appears culturally to be entirely different from M. aureus, has shown a certain amount of cross-agglutination when M. aureus serum is used. This cross-agglutination was noted in a series of several trials of this particular point. This serological relationship is interesting in light of the probable evolutionary development of the micrococci. If M. aureus is of comparatively recent origin from the evolutionary standpoint, it would be expected that a certain amount of group agglutinins would still be produced by this species. There appears to be a quite close relationship between M. aureus and M. aurantiacus as M. aurantiacus cross-agglutinated with M. aureus in a dilution of 1:400, while the homologous strain agglutinated in a dilution of 1:2000. Similar results were found when M. aureus was used against the M. aurantiacus serum.

The relationship between M. aureus and M. albus has always more or less been confused in various laboratories, especially when considered from a serological standpoint. M. aureus appears to be serologically distinct from M. albus and the conception that M. albus is a variety of M. aureus which has lost its power to produce pigment is not substantiated by the present results.

The species of white micrococci other than M. albus appear to show no cross-agglutination among themselves and very little cross-agglutination with other species, although in each instance the sera when tested against its own homologous strain had a high titre. Many other

strains, although closely associated culturally with those of white types, gave very little if any cross-agglutination. M. albus showed more cross-agglutination with other white strains and with yellow and orange types than did any other species of the white group.

Very little cross-agglutination was noted among the species of the yellow cocci even between cultures which were known to be very closely related in other respects. This is especially noticeable in the light of the results of the general cultural tests of M. luteus and M. varians. M. luteus differs culturally from M. varians in nitrate reduction alone, but in spite of this there was a sharp distinction shown by the agglutination reactions.

Of the two types of red cocci for which sera were prepared a considerable amount of group agglutinins appear to be present. M. roseus cross-agglutinated with M. cinnebareus in a dilution of 1:400, while it agglutinated with its own sera in a dilution of 1:1500. Evidently M. roseus and M. cinnebareus, altho showing a certain amount of specificity, are closely related serologically.

The results of the agglutination tests as applied to this group appear to be relatively constant, for upon repetition with freshly prepared sera practically the same instances of cross-agglutination, together with the large degree of specificity, were observed.

Agglutination Absorption.

As has been pointed out by Castellani (1902) and others, organisms may unite with agglutinins but still remain in suspension and fail to show any physical evidence of this union by the flocculation which is characteristic of a positive agglutination reaction. In order to ascertain definitely if the antigen unites with an antibody in the serum, the agglutination absorption method has been developed and is for very apparent reasons much more reliable and accurate than simple agglutination tests because of the fact that a negative agglutination may give misleading results.

The results of the agglutination absorption tests, as outlined in Table II, throw very little additional light on the serological relationships of the species of this group. It is evident that only in a few instances does a negative agglutination give misleading results and in such instances only in a matter of a difference of dilution.

Several interesting relationship can be noted from the absorption tests Table II. When using M. aureus sera, no cross-agglutination could be noted with closely related species in the group, indicating that the orange micrococci represented by M. aureus appear to be distinct from the rest of the group. M. albus did not appreciably absorb any of the agglutinins from M. aureus serum, but M. ureae and M. roseus, altho failing to give agglutination, showed some absorbing action upon the M. aureus serum.

The white strains show practically the same specificity from the standpoint of absorption as were seen in the agglutination. The agglutinins from M. ureae serum were absorbed in a greater number of cases by other members of this group than was true of any other of the sera. This is not entirely confined to agglutination absorption as evidences of cross-agglutination between M. ureae and other species can be seen Table I (S. 126).

Table

Studies on the agglutination absorption

Strains	Agglutination unabsorbed serum						
	50	100	400	750	1500	2000	3000
							M. aureus (385)—
M. aureus (385)	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M. albus (238)	+++	++	—	—	—	—	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	—	—
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	—	—	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	—	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	—	—
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	—	—
							M. albus (238)—
M. albus (238)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M. aureus (385)	+++	+	—	—	—	—	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	—	—
M. conglomeratus (62)	+++	+++	+	—	—	—	—
M. ureae (88)	+++	++	—	—	—	—	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	—	—
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	—	—
							M. flavus (196)—
M. flavus (196)	—	+++	+++	+++	+++	+++	+
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	—	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	—	—
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	—	—	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	—	—
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	—	—
							M. conglome
M. conglomeratus (62)	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	—	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	—	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	—	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	—	—
M. cinnebareus (349)	+++	—	—	—	—	—	—
							M. ureae (88)—
M. ureae (88)	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (385)	+++	—	—	—	—	—	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	—	—
M. conglomeratus (62)	+++	—	—	—	—	—	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	—	—
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	—	—
							M. roseus (213)—
M. roseus (213)	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	+++	—	—	—	—	—	—
M. flavus (195)	—	—	—	—	—	—	—
M. conglomeratus (62)	+++	—	—	—	—	—	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	—	—
M. cinnebareus (349)	+++	+++	+++	—	—	—	—

+ = Agglutination

II.
of various species of Micrococci.

Absorbed by	Agglutination absorbed serum									Controls
	absorbing strain					serum strain				
	50	100	400	750	2000	50	400	750	2000	
Serum										
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	++	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	++	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+	—
M. cinebareus (349)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	++	—
Serum										
M. albus (238)	+++	—	—	—	—	+	—	—	—	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	+++	+++	++	—	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	++	—
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
Serum										
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	++	—
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
ratus (62)—Serum										
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
Serum										
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. albus (385)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
Serum										
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	·	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	+++	+++	—	—	—

— = negative Agglutination

Strains	Agglutination unabsorbed serum						
	50	100	400	750	1500	2000	3000
							M. luteus (426)—
M. luteus (426)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M. varians (80)	—	—	—	—	—	—	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	—	—
M. candidus (401)	—	—	—	—	—	—	—
M. epidermidis (119)	—	—	—	—	—	—	—
							M. varians (80)—
M. varians (80)	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M. luteus (426)	+++	+++	—	—	—	—	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	—	—
M. candidus (401)	—	—	—	—	—	—	—
M. epidermidis (191)	—	—	—	—	—	—	—
							M. casei (111)—
M. casei (111)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
M. varians (80)	—	—	—	—	—	—	—
M. luteus (426)	—	—	—	—	—	—	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	—	—
M. candidus (401)	—	—	—	—	—	—	—
M. epidermidis (191)	—	—	—	—	—	—	—
							M. epider
M. epidermidis (191)	+	+++	+++	+++	+++	+++	—
M. varians (80)	++	—	—	—	—	—	—
M. luteus (426)	—	—	—	—	—	—	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	—	—
M. candidus (401)	—	—	—	—	—	—	—
							M. candidus (401)—
M. candidus (401)	+++	+++	+++	+++	++	—	—
M. epidermidis (191)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	+++	+++	+++	—	—	—	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	—	—
M. varians (80)	—	—	—	—	—	—	—
M. luteus (426)	—	—	—	—	—	—	—
							M. cinne
M. cinnebareus (349)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
M. roseus (213)	+++	+++	—	—	—	—	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	—	—
M. albus (238)	+++	—	—	—	—	—	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	—	—
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	—	—	—
M. ureae (88)	+++	—	—	—	—	—	—

M. candidus and M. epidermidis, which are so similar culturally, showed very little tendency to cross-agglutinate, but from the standpoint of absorption test these two species appeared more closely related serologically. M. epidermidis when used as an antigen will absorb agglutinin from M. candidus, but M. candidus when used as an antigen does not appear to absorb agglutinins from M. epidermidis serum.

Absorbed by	Agglutination absorbed serum									Controls
	absorbing strain					serum strain				
	50	100	400	750	2000	50	400	750	2000	
Serum										
M. luteus (426)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. varians (80)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. candidus (401)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. epidermidis (191)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
Serum										
M. varians (80)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. luteus (426)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. candidus (401)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. epidermidis (191)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
Serum										
M. casei (111)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. varians (80)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. luteus (426)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. candidus (401)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. epidermidis (191)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
midis (191)—Serum										
M. epidermidis (191)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. varians (80)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. luteus (426)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. candidus (401)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
Serum										
M. candidus (401)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. epidermidis (191)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. albus (238)	+	—	—	—	—	+++	++	+	—	—
M. aurantiacus (270)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. varians (80)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
M. luteus (426)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	—
bareus (349)—Serum										
M. cinnebareus (349)	—	—	—	—	—	++	—	—	—	—
M. roseus (213)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+	—
M. aureus (385)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. albus (238)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+	—
M. flavus (196)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—
M. conglomeratus (62)	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	—
M. ureae (88)	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+	—

The failure of M. aureus to cross-agglutinate with M. varians is misleading in light of the agglutination tests, as it was found that a certain amount of cross-absorption was evidenced in nearly all cases.

It was also noted in the absorption tests that M. roseus and M. cinnebareus showed a large amount of cross-agglutination with other species of this group. M. cinnebareus antigen absorbed agglu-

Table

Cross complement fixation

Sera	Am't of serum	Anti 385	238	270	191	401	484	88
M. aureus (385) . . .	ccm .01	*0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	.005	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	.001	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	.0005	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
M. aurantiacus (270) . . .	.01	++++	++++	0	++++	++++	——	——
	.005	++++	++++	0	++++	++++	——	——
	.001	++++	++++	0	++++	++++	——	——
	.0005	++++	++++	0	++++	++++	——	——
M. albus (238) . . .	.01	++++	0	++++	++++	——	0	++++
	.005	++++	++++	++++	++++	——	0	++++
	.001	++++	0	++++	++++	——	0	++++
	.0005	++++	0	++++	++++	——	0	++++
M. epidermidis (191)	.01	++++	++++	++++	++++	——	++++	++++
	.005	++++	++++	++++	++++	——	++++	++++
	.001	++++	++++	++++	0	——	++++	++++
	.0005	++++	++++	++++	0	——	++++	++++
M. candidus (401) .	.01	——	——	——	++++	0	——	——
	.005	——	——	——	++++	0	——	——
	.001	——	——	——	++++	0	——	——
	.0005	——	——	——	++++	0	——	——
M. tetragenus (484) .	.01	——	0	——	——	——	0	——
	.005	——	0	——	——	——	0	——
	.001	——	0	——	——	——	0	——
	.0005	——	0	——	——	——	0	——
M. ureae (88) . . .	.01	——	——	——	++++	——	——	0
	.005	——	——	——	++++	——	——	0
	.001	——	——	——	++++	——	——	0
	.0005	——	——	——	++++	——	——	0
M. casei (111) . . .	.01	——	——	——	++++	——	——	++++
	.005	——	——	——	++++	——	——	++++
	.001	——	——	——	++++	——	——	++++
	.0005	——	——	——	++++	——	——	++++
M. flavus (196) . . .	.01	——	——	——	——	——	——	——
	.005	——	——	——	——	——	——	——
	.001	——	——	——	——	——	——	——
	.0005	——	——	——	——	——	——	——
M. conglomeratus (62) . . .	.01	——	——	——	——	——	——	——
	.005	——	——	——	——	——	——	——
	.001	——	——	——	——	——	——	——
	.0005	——	——	——	——	——	——	——
M. luteus (426) . . .	.01	——	——	——	——	——	——	——
	.005	——	——	——	——	——	——	——
	.001	——	——	——	——	——	——	——
	.0005	——	——	——	——	——	——	——

111.
of the species of Micrococci.

gen 111	62	196	167	426	80	213	349
++++	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
—	++++	—	++++	—	++++	—	—
—	++++	—	++++	—	++++	—	—
—	++++	—	++++	—	++++	—	—
—	++++	—	++++	—	++++	—	—
++++	++++	++++	++++	—	++++	—	—
++++	++++	++++	++++	—	++++	—	—
++++	++++	++++	++++	—	++++	—	—
++++	++++	++++	++++	—	++++	—	—
++++	++++	++++	++++	—	0	—	—
++++	++++	++++	++++	—	++++	—	—
++++	++++	++++	++++	—	++++	—	—
++++	++++	++++	++++	—	++++	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
++++	—	—	—	—	—	—	—
++++	—	—	—	—	—	—	—
++++	—	—	—	—	—	—	—
++++	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—
—	++++	0	—	—	—	—	—
—	++++	0	—	—	—	—	—
—	++++	0	—	—	—	—	—
—	+++	0	—	—	—	—	—
0	—	++++	—	—	++++	—	—
0	—	++++	—	—	++++	—	—
0	—	++++	—	—	++++	—	—
0	—	++++	—	—	++++	—	—
—	—	++++	—	0	++++	—	—
—	—	++++	—	0	++++	—	—
—	—	++++	—	0	++++	—	—
—	—	++++	—	0	++++	—	—

Sera	Am't of serum	An						
		385	238	270	191	401	484	88
M. varians (80) . . .	ccm							
	.01	++++	++++	++++	++++	——	——	++++
	.005	++++	++++	++++	++++	——	——	++++
	.001	++++	++++	++++	++++	——	——	++++
	.0005	++++	++++	++++	++++	——	——	++++
M. citreus (167) . . .	.01	++++	++++	++++	++++	——	——	++++
	.005	++++	++++	++++	++++	——	——	++++
	.001	++++	++++	++++	++++	——	——	++++
	.0005	++++	++++	++++	++++	——	——	++++
M. roseus (213) . . .	.01	——	——	——	——	——	——	——
	.005	——	——	——	——	——	——	——
	.001	——	——	——	——	——	——	——
	.0005	——	——	——	——	——	——	——
M. cinnebareus (349).	.01	——	——	——	——	——	——	——
	.005	——	——	——	——	——	——	——
	.001	——	——	——	——	——	——	——
	.0005	——	——	——	——	——	——	——

*0 = No hemolysis, ++++ = complete hemolysis.

tinins from M. roseus serum, while M. roseus antigen absorbed agglutinins from M. cinnebareus serum only in a slight degree.

Complement Fixation.

Altho agglutination and agglutination absorption will in most inmost instance give reliable results, serologists are agreed that the fixation of complement is the most specific and accurate means of serologically differentiating various strains of bacteria. The application of this test to this group has given some very interesting as well as definite results. In the above work dealing with the agglutination absorption considerable cross absorption has been noted. However, in the results of the complement fixation the specificity of the various cultures has been very pronounced. A study of Table III will show immediately that very little if any cross fixation was evident even between species which have heretofore been considered very closely related. M. aureus and M. albus in no instance evidenced any cross fixation, nor did M. aureus and M. aurantiacus show any tendency to cross complement. As has been pointed out in an earlier paper (Hucker, 1924) this particular character of specificity from the standpoint of fixation of complement, together with the differences in action upon gelatin, has served as the basis for the separation of M. aurantiacus from M. aureus.

Of the white forms, one particular point may be noted, namely, the cross fixation in all dilutions between M. albus and M. tetragenus. This observation is interesting from the fact that M. tetragenus, altho producing scanty white growth on agar slants, has very little in common culturally with M. albus. Many investigators have felt that it was sufficiently distinct from M. albus and related species to place it in an entirely different genus. However, this cross fixation seems to indicate that it is probably a type which should

tigen							
111	62	196	167	426	80	213	349
++++	++++	++++	++++	——	0	——	——
++++	++++	++++	++++	——	0	——	——
++++	++++	++++	++++	——	0	——	——
++++	++++	++++	——	0	——	——	——
++++	++++	0	0	++++	++++	——	——
++++	++++	++++	0	++++	++++	——	——
+±++	++++	++++	++++	++++	++++	——	——
++++	++++	++++	++++	++++	++++	——	——
——	——	——	——	——	——	0	++++
——	——	——	——	——	——	0	++++
——	——	——	——	——	——	0	++++
——	——	——	——	——	——	0	++++
——	——	——	——	——	——	++++	0
——	——	——	——	——	——	++++	0
——	——	——	——	——	——	++++	0
——	——	——	——	——	——	++++	0

—— = Test not tried.

be included in the genus Micrococcus as one of the most strictly parasitic species.

M. epidermidis, which as has been pointed out above differs from M. candidus only in the matter of nitrate reduction, shows certain results in the complement fixation similar to those noted in the agglutination and absorption tests. In the lower dilutions certain amounts of cross fixation were noted. The relationship between M. luteus and M. varians, which are comparable species among the yellow forms of this group, did not appear to be so striking.

Conclusions.

It is evident from the foregoing results that the species of micrococci studied in this investigation, with one exception, are serologically distinct. The possible exception is due to the fact that M. albus and M. tetragenus showed a certain amount of cross-agglutination and cross complement fixation. However, the morphological and cultural differences between these two organisms indicate that they are separate and distinct species.

The specificity of the various sera prepared for the species of micrococci studied would indicate that the chief value of the results of a serological study are from the standpoint of differentiating species and not from the standpoint of separating larger groups.

The large amount of group agglutinins evidenced in many instances would also indicate that this group containe a number of species which are more or less closely related and bears out the conception that all irregular mass-forming cocci should be placed in one genus.

Bibliography.

Altmann, K. a. Blühdorn, C., Komplementbindung bei Staphylokokken und Sarcinen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. 1910. S. 87—96.) — Altmann, K. a. Schultz, J. H., Verwendung von Bakterien-Antiformin-extrakten als Antigene bei der Komplementbindung. (Zeitschr. f. Immunitätsf. H. 3 1909. S. 98—107.) — Axenfeld, T., Die Bakteriologie in der Augenheilkunde. 362 pp. Jena 1907*. — Ballner, F. a. Reibmayr, H., Ueber die Verwertbarkeit der Komplementablenkungsmethode für die Differenzierung von Mikroorganismen, nebst Bemerkungen über den Zusammenhang dieses Phänomens mit der Agglutinations- bzw. Präzipitationsreaktion. (Arch. f. Hyg. Bd. 64. 1907. S. 113—154.) — Bruck, S. u. Hidaka, C., Biologische Untersuchungen über die Rolle der Staphylokokken bei Ekzemen. (Arch. f. Derm. u. Syph. Bd. 100. 1911. S. 165.) — Castellani, A., Die Agglutination bei gemischter Infektion und die Diagnose der letzteren. (Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. 40. 1902. I.) — Courmont, J. Sur les propriétés des produits solubles du staphylocoque pyogène. (La Semaine méd. T. 14. 1894. p. 559.) — Ders., Propriétés differrentes du serum des lapins prédisposés à l'infection a staphylococque et de celui des lapins vaccinés contre le même microbe. (Congrés francais de Médecine interne tenu à Lyon du 25 au 29 octobre, 1894; La Semaine méd., T. 14. 1894a. p. 502.) — Flügge, C., Aetiologie und Prophylaxe der Wundinfektion. (Zeitschr. f. ärztl. Fortbild. 1910*. Nr. 17. S. 513.) — Fraenkal, C. u. Baumann, E., Ueber Hämolysinbildung und Agglutination der Staphylokokken. (Münch. med. Wochenschr. Bd. 52. 1905. S. 937.) — — Hines, T. G. M., Serological classification of the staphylococci. (Lancet, 1922. Vol. 1. p. 1380.) — Hucker, G. J., Studies on the Coccaceae. (N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bulletins No. 99, 100, 101, 102, 103. 1924.) — Julianelle, L. A., Studies of hemolytic staphylococci. (Journ. Inf. Dis. Vol. 31. 1922. p. 256—284.) — Jung, P., Beitrag zur Kenntnis der Vaginalstaphylokokken. (Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gyn. Bd. 64. 1909. S. 505—522.) — Klopstock, M. u. Bockenheimer, Beitrag zur Agglutination der Staphylokokken. (Arch. f. klinisch. Chirur. Bd. 72, 1904. S. 325.) — Kolle, W. u. Otto, R., Die Differenzierung der Staphylokokken mittels der Agglutination. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 41. 1902. S. 369—379.) — Kraus R. u. Löw, L., Ueber Agglutination. (Wien. klin. Wochenschr. Bd. 12. 1899. S. 95—98.) — Kraus, R., Ueber Hämolysine und Antihämolysine. (Wien. klin. Wochenschr. Bd. 13. 1900. S. 49—56.) — Ders., Ueber Wirkungen der Bacteriohämolysine im Organismus. (Wien. klin. Wochenschr. Bd. 15. 1902. S. 382—387.) — Landsteiner, K., Ueber die Folgen der Einverleibung sterilisierter Bakterienkulturen. (Wien. klin. Wochenschr. Bd. 10. 1897. S. 438—444.) — Lohr, A., Zur Frage der Hämolysinbildung pathogener Staphylokokkenstämme auf Grund eines Falles von Staphylokokkensepsis bei einer Puerpera. (Münch. med. Wochenschr. Bd. 52. 1905*. Nr. 11, S. 504—506.) — MacFarland, J., The nephelometer. (Journ. Amer. Med. Assoc. Vol. 49. 1907. p. 1178.) — Mircoli, S. Immunizzazione del coniglio contro la setticemia da stafilococco piogeno. (Gaz. degli Ospedali. 1894*. No. 20. p. 203.) — Mantegazza, U., Contributo allo studio delle emolisine ed agglutinine stafilococciche in dermatologia. (Annali d'Igiene Speriment. 1908*. No. 1. (Biochem. Centralbl. Bd. 8. S. 226. 1908—09.) — Neisser, Max u. Wechsberg, F., Ueber das Staphylotoxin. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 36. 1901. S. 299—349.) — Nicolas, J. a. Lesieur, Ch., Sur l'agglutination du staphylocoque doré par le sérum d'animaux vaccinés et infectes. (La Semaine méd. Vol. 21. 1901. p. 37.) — Orcutt, Marion a. Howe, P. E., Hemolytic action of a staphylococcus due to a fat splitting enzyme. (Journ. Exp. Med. Vol. 35. 1922. p. 409—420.) — Otto, R., Weitere Beiträge zur Agglutination der Staphylokokken. (Oentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 34. 1903. S. 44—48.) — Pröscher, E. Ueber die künstliche Immunität gegen Staphylokokken. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 34. 1903. S. 437—445.) — Ders., Ueber Antistaphylokokkenserum. (Dtsch. Med. Wochenschr. Bd. 29. 1903a. S. 195—196.) — Reichenbach, H., Ueber Immunisierungsversuche gegen Staphylococcus pyogenes aureus. (Beitr. z. klin. Chirurgie. Bd. 18. 1897*. Heft 1.) — Silvestrini, R., Potere agglutinante del sangue su colture in brodo di stafilococco in due casi infezione stafilococcica. (Settimana Medici, April 2. 1898.) — Trincas, L., Sull' agglutinazione degli stafilococchi. Gazetta degli Ospedali. No. 104. (Biochem. Centralbl. Bd. 8. 1908. S. 609.) — Walker, I. C. a. Adkinson, June, Studies on Staphylococcus pyogenes aureus, albus, and citreus and on Micrococcus tetragenus and M. catarrhalis. (Journ. Med. Res. Vol. 35 (N. S. 30). 1917. p. 373—390.) — Wolf, S., Beiträge zur Kenntnis der Wirkungsweise der Staphylokokken- und Pneumokokkenstoffwechselprodukte. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 20. 1896. S. 375—386.)

*Seen only in abstract.

Nachdruck verboten.

Ueber mit Typhusserum agglutinierende Proteus-Stämme.

[Aus dem Hygiene-Institut in Warschau (Direktor: Dr. L. Rajchman).]

Von Priv.-Doz. Dr. **Stanislaw Sierakowski,**
Abteilungsleiter des Staatlichen Hygiene-Instituts in Warschau.

Als ich das Wasser der Weichsel unter Warschau auf Anwesenheit von Choleravibrionen mittels der Peptonwassermethode untersuchte, habe ich Bakterien (Stamm 105), gezüchtet, welche nur mit Typhusserum, nicht aber mit Normalserum agglutinierten. Bei näherer Untersuchung dieses Stammes erwies sich, daß es stark bewegliche, gramnegative Stäbchen sind; sie verflüssigten Gelatine, zersetzten unter Säurebildung Dextrose und Mannit, ließen aber Laktose unverändert. Lackmusmolke blieb während der ersten 48 Std. unverändert, später wurde sie schwach alkalisch. Milch gerinnt nach 4 Tagen; die Reaktion der geronnenen Milch war alkalisch. Peptonwasser wird leicht getrübt ohne Häutchenbildung, Indolreaktion positiv.

2 Wochen später habe ich ähnliche Bakterien (Stamm 177) aus den Fäzes einer Person, welche unter Cholerasymptomen (Durchfall, Erbrechen) erkrankte, gezüchtet. Die zur Untersuchung gesandten Fäzes waren ganz weiß und schleimig. In Peptonwasserkulturen und auf aus den letzteren angelegten Alkaliagarplatten wuchsen ziemlich durchsichtige Kolonien von mittlerer Größe, die glatt mit gezacktem Rande waren. Dieser Stamm agglutinierte nur mit Typhusserum (orientierende Agglutinationsprobe). Die morphologischen Eigenschaften und das Verhalten auf verschiedenen Nährböden waren dieselben, wie die des Stammes 105.

Zur näheren Untersuchung habe ich ein Kaninchen mit Stamm 105 immunisiert. Schon nach einigen intravenösen Einspritzungen agglutinierte das Serum des immunisierten Kaninchens den homologen Stamm 105 sowie den Stamm 177 bis zur Verdünnung 1:6400. Auf diese Weise wurde nochmals festgestellt, daß die 2 Stämme identisch sind. Obwohl die Stämme mit Typhusserum agglutinieren, machen doch das Verhalten derselben auf Zuckernährböden, das Verflüssigen der Gelatine und die Indolreaktion wahrscheinlich, daß wir es nicht mit Typhusbakterien zu tun hatten. Von anderen Bakteriengattungen, die zur Differentialdiagnose dieser Stämme in Betracht kommen können, sind B. coli, Paratyphus A und Paratyphus B wegen Gelatineverflüssigung und B. alcaligenes wegen Zersetzung der Zuckernährböden auszuschließen. Bakterien aber mit den oben erwähnten Eigenschaften entsprechen der Proteus-Bakteriengattung.

Stamm 105 agglutinierte mit Typhuspferdeserum bis zur Verdünnung 12800:25600 (der Zähler bedeutet die Höhe der Agglutination des Stammes; der Nenner den Serumtiter). Mit Normalserum agglutiniert dieser Stamm höchstens bis zur Verdünnung 1:200. Stamm 177 agglutiniert mit demselben Typhuspferdeserum bis 6400:25600, mit Normalserum aber gab er keine Agglutination. Mit einem anderen Typhuspferdeserum agglutiniert Stamm 105 bis zur Verdünnung 25600:51000, Stamm 177 bis 4800:19200, also bis zu derselben Höhe.

Ich habe auch versucht, die Stämme 105 und 177 mit Typhusseren, die bei anderen Tieren gewonnen wurden, zu agglutinieren. Mit

Kaninchentyphusserum agglutinierten die beiden Stämme bis zur Titerhöhe. Es geht daraus hervor, daß die Proteusstämme 105 und 177 bis zu einem hohen Grade mit Typhusserum agglutinieren; die beiden Stämme stehen sogar in dieser Hinsicht den Typhusstämmen nicht nach. Zur Agglutination habe ich immer eine frische 24stünd. Agarkultur benutzt. Die Agglutination geht rasch vor sich; sie ist schon nach 1 Std. bei Brutschrank-Temperatur beendet, und zwar unter charakteristischer Flockenbildung.

Es war nun die Frage, ob die Agglutination der Proteus-Stämme 105 und 177 mit Typhusserum sich in qualitativer Hinsicht (Aussehen der Flocken, Größe des Sediments) von der Agglutination dieser Stämme durch homologes Serum 105 unterscheidet. Zu diesem Zwecke habe ich zu einer Reihe Verdünnungen von Typhus- und 105-Serum die gleichen Mengen einer und derselben Bakterienaufschwemmung des Stammes 105 zugesetzt. Qualitativ war in beiden Fällen kein Unterschied zu sehen. Das Typhusserum in der Verdünnung 1:3200 gab dasselbe Sediment wie das 105-Serum in Verdünnung 1:800.

Die untersuchten Stämme habe ich fast 3 Jahre 1mal im Monate auf künstliche Nährböden überimpft; sie behielten die ganze Zeit ihre Agglutinationseigenschaften bei. Nachdem festgestellt war, daß die oben beschriebenen Proteus-Stämme mit Typhusserum agglutinierten, habe ich geprüft, ob sie auch unter Komplementablenkung und Präzipitation reagieren.

Die Komplementablenkungsreaktion wurde auf folgende Weise ausgeführt: 1) als Antigen benutzte ich eine entsprechende, von der Agaroberfläche gewonnene Bakterienaufschwemmung (die längere Zeit im Schüttelapparat geschüttelt, dann stark zentrifugiert worden war), zur Reaktion nahm ich die über dem Sediment schwach opalisierende Flüssigkeit; 2) Typhusserum nahm ich in Verdünnung 1:20; 3) Komplement-Meerschweinchenserum in doppelt lösender Dose; 4) hämolytischer Ambozeptor, 4fache Dose; 5) Hammelblutkörperchen, 5proz., gut gewaschen.

Die Ergebnisse waren folgende: Typhusserum mit Typhusantigen gibt eine Hemmung in Verdünnung von 1:16; dasselbe Typhusserum mit Antigen 105 hemmt in Verdünnung 1:32; mit Normalserum geben beide Antigene keine Komplementablenkung; die Antigenkontrolle ohne Serum war negativ.

Der Stamm 105 gibt demnach mit Typhusserum Komplementablenkung.

Flatzek hat Komplementablenkung mit paraagglutinierenden Stämmen ausgeführt und erhielt positive Ergebnisse nur mit den stärker agglutinierenden Stämmen.

Ich arbeitete in derselben Richtung mit paraagglutinierenden Stämmen und kam zum gleichen Schlusse. Komplementablenkung gaben nur diejenigen Stämme, welche am stärksten agglutinierten.

Für die Präzipitation habe ich folgenden Bakterienextrakt benutzt: eine dichte, von der Agaroberfläche gewonnene Bakterienaufschwemmung schüttelte ich 48 Std. im Schüttelapparat, setzte 0,5 Proz. Phenol zu und ließ einige Monate in einem schmalen Zylinder absetzen. Zur Reaktion benutzte ich die über dem Sediment stehende klare Flüssigkeit. Auf diese Weise wurden die Extrakte aus Typhusbakterien und Stamm 105 vorbereitet. Die Reaktion wurde so ausgeführt, daß zu

1 ccm Extrakt 1 ccm entsprechend verdünnten Serums zugesetzt wurde und nach Umrühren die Röhrchen 24 Std. im Brutschrank stehen gelassen wurden. Als Kontrolle wurden angesetzt: 1) Extrakt ohne Serum, 2) Serum ohne Extrakt, 3) Extrakt plus Normalserum. Die Ergebnisse waren folgende: Bakterientyphusextrakt mit Typhuspferdeserum gab eine Flockung höchstens in Verdünnung 1:3200, dagegen gab Proteus-Extrakt 105 mit Typhuspferdeserum keine Flockung, sogar in Verdünnung 1:50.

Serum 105 gab Flockung mit Proteus 105 noch in Verdünnung 1:1600, mit Typhusbakterien aber keine Reaktion, wie zu erwarten war. Mit Normalserum gaben beide Extrakte keine Flockung.

Die Proteusbakterien 105 gaben also mit Typhusserum keine Präzipitationsreaktion.

Was die Castellanischen Adsorptionsproben anbetrifft, wurde die Adsorption so ausgeführt, daß ich zu einer Reihe Röhrchen mit gleichen Mengen Typhusserum in Verdünnung 1:450 steigende Mengen 105-Bakterien und zur 2. Reihe steigende Mengen Typhusbakterien zugab. Die Röhrchen ließ ich 2 oder 3 Std. im Brutschrank und dann bis zum nächsten Tage bei Zimmertemperatur stehen, worauf sie stark zentrifugiert und auf Agglutination untersucht wurden. Als Kontrolle wurde spezifisches und normales Serum ohne Absorption angestellt.

Tabelle I.

2 ccm Tyserum in Verdünnung 1:450 absorbiert mit	Agglutination nach der Absorption mit	
	Proteus 105	Typhusbakterien
0,1 mg Proteus-Kultur 105	1:500 —	1:16 000 +
1,0 „ „ 105	1:500 —	1:16 000 +
5,0 „ „ 105	1:500 —	1:16 000 +
0,1 „ Typhuskultur	1:500 —	1:16 000 +
1,0 „ „	1:500 —	1:16 000 +
5,0 „ „	1:500 —	1:2 000 +
1. Kontrolle des Tyserums ohne Absorption	1:8000 +	1:16 000 +
2. Kontrolle des Normalserums	1:200 +	1: 200 +

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß ganz kleine Mengen (0,1 mg) TyBa und Proteus 105-Ba aus dem Tyserum Agglutinine Anti 105 absorbieren; dagegen absorbiert Proteus 105 in 50facher Menge keine Typhusagglutinine; die TyBa in dieser Menge absorbieren den größten Teil der Ty-Agglutinine. Es war nun fraglich, ob viel größere Mengen Proteus Ba 105 fähig sind, aus dem Typhusserum alle Ty-Agglutinine zu absorbieren, so daß das Tyserum nicht mehr imstande wäre, TyBa zu agglutinieren. Zu diesem Zwecke habe ich folgenden Versuch angestellt: Zu einer Portion TySe in Verdünnung 1:1000 habe ich 50 mg Proteus Ba 105 (Agarkultur, getötet bei 60 Proz., 30 Min.), zur 2. — 0,1 mg TyBa (500mal kleinere Menge erhalten so wie Ba 105) zugesetzt. Als Kontrolle nahm ich TySe in Verdünnung 1:1000 ohne Bakterien. Alle Röhrchen standen 2 Std. im Brutschrank und bis zum nächsten Tage im Kühlraum. Dann habe ich zur 1. Portion wieder 50 mg Proteus Ba 105 und zur 2. 0,1 mg TyBa zugesetzt. (Die Verdünnungen in beiden Portionen waren gleich.) Zur Serumkontrolle ohne Bakterien wurde die gleiche Menge NaCl zugegeben. Diese Manipulationen wurden 4mal wiederholt, bis das TySe die TyBa nicht mehr

zusammenballte. Dann wurden beide Portionen stark zentrifugiert und die über dem Sediment stehende Flüssigkeit auf Agglutination untersucht. Die Ergebnisse waren folgende:

1) Die Kontrolle TySe ohne Absorption agglutiniert mit TyBa höchstens bis Verd. 1:32000. — 2) TySe, welches mit 5facher Menge 0,1 mg TyBa absorbiert war, gab keine Agglutination. — 3) Dagegen agglutiniert TySe, welches mit 5facher Menge 50 mg ProteusBa 105 absorbiert war, TyBa bis zum Titer so wie die Kontrolle. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß eine gewisse Menge TyBa aus einer bestimmen Mengte TySe alle Ty-Agglutinine absorbiert, wogegen die ProteusBa 105 in 500facher größerer Menge nicht imstande sind, aus demselben Serumvolumen die kleinsten Mengen von Agglutininen zu absorbieren. So sehen wir, daß die TyBa sehr gierig Agglutinine Anti 105 absorbieren, welche sich im TySe befinden, wogegen die Ba 105 die Ty-Agglutinine nicht absorbieren. Es ist somit kein Zweifel, daß die von mir beschriebene Proteus-Agglutination mit dem TySe eine Mitagglutination ist. Diese Ansicht bestätigt auch die Tatsache, daß Serum 105, welches durch Immunisierung eines Kaninchens mit Stamm 105 erhalten wurde, keine TyBa zusammenballt und keine Ty-Agglutinine enthält.

Wie schon erwähnt, agglutinieren die ProteusBa 105 nicht nur mit Pferde-Tyserum, sondern auch mit Kaninchen-Tyserum. Wie verhält sich nun dieser Stamm zu Patienten-Typhusserum? Zu diesem Zwecke habe ich eine ganze Reihe Typhuskranken-Sera mit Stamm 105 zusammengebracht. Zur Kontrolle wurde gleichzeitig Agglutination mit TyBa und Proteus X 19 angestellt. Die Agglutination war makroskopisch in folgenden Verdünnungen: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600. Zu jeder Reihe habe ich 1 Tropfen entsprechender Bakterienaufschwemmung zugesetzt und nach Umrühren auf 2—3 Std. in den Brutschrank gestellt. Als positiv anerkannte ich nur die Agglutination, wo sich große Flocken bildeten, denn feinkörnige Flocken gab nicht selten auch Normalserum. Tabelle II zeigt die Ergebnisse der 1. Untersuchungsserie.

Tabelle II.

Nr.	Agglutination mit		Nr.	Agglutination mit		Nr.	Agglutination mit	
	105	TyBa		105	TyBa		105	TyBa
1	1:1600 +	1:1600 +	17	1:400 +	1:200 +	33	1:100 +	1:400 +
2	1:800 +	1:800 +	18	1:400 +	1:400 +	34	1:400 +	1:100 +
3	1:200 +	1:400 +	19	1:200 +	1:400 +	35	1:100 +	1:200 +
4	1:100 +	1:100 +	20	1:50 —	1:200 +	36	1:400 +	1:400 +
5	1:400 +	1:800 +	21	1:100 +	1:100 +	37	1:200 +	1:400 +
6	1:400 +	1:200 +	22	1:200 +	1:200 +	38	1:200 +	1:200 +
7	1:100 +	1:400 +	23	1:400 +	1:400 +	39	1:400 +	1:400 +
8	1:400 +	1:400 +	24	1:400 +	1:200 +	40	1:400 +	1:400 +
9	1:400 +	1:100 +	25	1:100 +	1:200 +	41	1:100 +	1:100 +
10	1:100 +	1:100 +	26	1:100 +	1:100 +	42	1:50 +	1:100 +
11	1:400 +	1:1600 +	27	1:100 +	1:100 +	43	1:400 +	1:200 +
12	1:800 +	1:200 +	28	1:400 +	1:400 +	44	1:200 +	1:200 +
13	1:400 +	1:400 +	29	1:200 +	1:100 +	45	1:400 +	1:800 +
14	1:200 +	1:800 +	30	1:400 +	1:1600 +	46	1:50 +	1:100 +
15	1:800 +	1:800 +	31	1:100 +	1:100 +	47	1:400 +	1:100 +
16	1:800 +	1:800 +	32	1:800 +	1:400 +			

Unter 47 Krankensera, bei denen die Widalsche Reaktion positiv ausfiel, war nur 1 Serum, d. h. 2 Proz., welches mit Ba 105 nicht agglutinierte.

1 Jahr später habe ich die 2. Serie von Untersuchungen ausgeführt, welche ähnliche Ergebnisse gab. Unter 73 Tykrankensera, welche mit TyBa agglutinierten, agglutinierten 92 Proz. auch mit Proteus 105 und nur 8 Proz. war negativ.

So ergibt sich, daß der größte Teil der Tykrankensera, welche die Widalsche Reaktion geben, auch die ProteusBa 105 zusammenballen (in der 1. Serie ca. 98 Proz., in der 2. 92 Proz.).

Ich habe weiter untersucht, ob Stamm 105 mit anderen Seren, welche TyBa nicht zusammenballen, auch agglutiniert. Zu diesem Zwecke habe ich eine ganze Reihe Kontrollversuche angestellt. In der 1. Serie wurden 77 Sera, welche TyBa nicht agglutinierten, untersucht: davon agglutinierten 6 (also 8 Proz.) mit Stamm 105, die übrigen 92 Proz. gaben keine Agglutination. In der 2. Serie habe ich 147 Kontrollsera untersucht: 93 Proz. von diesen gaben keine Agglutination, 7 Proz. dagegen waren positiv, woraus sich ergibt, daß Sera, welche TyBa nicht zusammenballen, meistens (92—93 Proz.) auch die Ba 105 nicht agglutinieren. Die Agglutination des Stammes 105 kommt demnach vor: fast bei allen Typhusfällen, nicht aber bei anderen Krankheiten. Das bedeutet, daß die Agglutination mit Stamm 105 für Typhus abdominalis spezifisch ist, so wie die Weil-Felixsche Reaktion bei Fleckfieber. Einige Ausnahmen können diese Behauptung nicht widerlegen, denn bekanntlich kommt bei Typh. abdominalis nicht in allen Fällen ohne Ausnahme die Agglutination der Patientensera mit TyBa zustande, und sie kommt auch manchmal bei anderen Krankheiten vor.

Weiter wollen wir den Titer der Tykrankensera für TyBa, welche im ätiologischen Zusammenhang mit der Krankheit stehen, und für ProteusBa 105 vergleichen.

Tabelle III.

Prozent der Sera		
1. Serie	2. Serie	
47 Prozent	54 Prozent	agglutiniert zur selben Verd. Proteus Ba 105 und TyBa
30 „	21 „	agglutiniert in geringeren Verd. Proteus Ba 105 als TyBa
21 „	25 „	agglutiniert in höheren Verd. Proteus Ba 105 als TyBa

Daraus ergibt sich, daß die Hälfte der Sera TyBa und Proteus-Ba 105 in denselben Verdünnungen agglutiniert, ca. $^1/_4$, und daß die TyBa höher als die ProteusBa 105 und $^1/_4$ die paragglutinierenden Ba 105 höher als die spezifischen agglutinieren. Die Differenz im Agglutinationstiter eines Serums, welches 2 Bakteriengattungen agglutiniert, erlaubt somit noch nicht, über die Aetiologie der Krankheit zu sprechen. Ein ähnliches Phänomen beschrieb Seligmann. Das Serum eines Shiga-Kranken agglutinierte nicht nur ShigaBa, sondern auch FlexnerBa, und zwar sogar bis zur höheren Verdünnung als die ShigaBa.

Die Agglutination mit Ty- und ProteusBa 105 erscheint im Blute des Typhuskranken nicht immer gleichzeitig. Es gibt Fälle, wo z. B. das Krankenserum mit TyBa in Verdünnung 1:1000 agglutiniert und ProteusBa 105 1:100—; nach einigen Tagen agglutiniert das Serum desselben Kranken mit TyBa in Verdünnung 1:1000 und mit Proteus-Ba 105 1:200+. Die Agglutination mit ProteusBa 105 erschien also erst später. Noch in einem anderen Falle agglutinierte das Krankenserum mit TyBa nicht, dagegen mit ProteusBa 105 bis zur Verdünnung 1:1000+. Bald darauf endete der Fall mit tödlichem Ausgang. Während der Sektion wurde festgestellt: Typhusdarmgeschwüre, Peritonitis nach Darmruptur; die angelegte Gallenkultur aus dem Sektionsmaterial gab Typhusreinkulter. Es handelte sich also zweifellos um einen Fall von Typhus abdominalis, welcher Agglutination mit **Proteus**Ba 105, nicht aber mit TyBa gab.

Weiter habe ich untersucht, ob das Serum von prophylaktisch gegen Typhus geimpften Menschen auch ProteusBa agglutiniert. 9 Patienten wurden 2mal geimpft, das Blut 1 Woche nach der letzten Impfung untersucht. Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle.

Tabelle IV.

Agglutination des Serums von Personen, die gegen Typh. abd. geimpft waren										
Nr.	mit TyBa					mit Proteus 105 Ba				
	1:200	1:400	1:1000	1:2500	1:10000	1:200	1:400	1:1000	1:2500	1:10000
1	+++	+++	++	—	—	+++	+++	+++	+	—
2	+++	+++	+++	+	—	++	++	—	—	—
3	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	+++	++	—	—	—	+++	++	—	—	—
6	+++	++	—	—	—	+++	++	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—
9	+++	++	+	—	—	+++	++	—	—	—

Hieraus folgt, daß das Serum von prophylaktisch gegen Typhus geimpften Personen auch ProteusBa 105 agglutiniert.

Ich habe weiter geprüft, welchen Einfluß das Erwärmen an den Agglutinationstiter des Serums, welches gleichzeitig Ty und Proteus-Ba 105 agglutiniert, ausübt. Zu diesem Zwecke nahm ich: 1) zwei Typhuskrankensera, welche TyBa und ProteusBa 105 agglutinieren; 2) Pferdetyphusserum, welches auch beide Stämme agglutiniert; 3) Serum 105, welches durch Immunisierung eines Kaninchens mit Stamm 105 erhalten war (das Serum agglutinierte nur Ba 105). Einzelne Portionen dieser Sera wurden 1 Std. bei 55°, 60° und 65° C erwärmt, worauf die Agglutination mit Ty und Proteus 105 Ba ausgeführt wurde. Als Kontrolle diente nicht erwärmtes Serum. Die Ergebnisse waren folgende:

I. Typhuskrankensera, welche gleichzeitig TyBa und ProteusBa 105 agglutinieren,

a) bei 55° C 1 Std. erwärmt, TyBa etwas schwächer als die Kontrolle mit nicht erwärmten Sera, dagegen Proteus 105 ohne Unterschied; b) bei 60° C 1 Std. erwärmt, agglutiniert TyBa nicht, dagegen

ProteusBa 105 so wie die Kontrolle; c) bei 65° C 1 Std. erwärmt, agglutiniert TyBa nicht und ProteusBa 105 etwas schwächer als die Kontrolle.

II. Pferdetyphusserum 1 Std. bei 55°, 60° und 65° C agglutiniert TyBa so wie die Kontrolle, dagegen ProteusBa 105 desto schwächer, je stärker es erwärmt ist. (Das Gegenteil im Vergleich mit Typhuskrankensera.

III. Serum 105 1 Std. bei 55°, 60°, 65°, 70° C, agglutiniert ProteusBa 105 so wie Kontrolle (ähnlich wie Typhuskrankensera).

Daraus geht hervor, daß der Einfluß eines erwärmten Serums, welches gleichzeitig TyBa und ProteusBa 105 agglutiniert, mit der Herabsetzung des Agglutinationstiters nicht im Zusammenhange steht, daß einer von den Stämmen spezifisch und der andere paragglutinierend ist, sondern von der Serumherkunft abhängt.

Nachdem der Einfluß der erwärmten Sera auf den Agglutinationstiter festgestellt war, habe ich noch untersucht, welchen Einfluß das Erwärmen der Kultur auf die Agglutination mit Ty- und 105-Serum ausübt. Zu diesem Zwecke habe ich einzelne Portionen einer und derselben, mit physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmten Proteus-Agarkultur 1 Std. bei 60°, 75°, 80°, 90° C und 15 Min. bei 100° C erwärmt, worauf die Agglutination auf folgende Weise ausgeführt wurde: a) mit spezifischem Serum 105, b) mit Pferdetyphusserum, und c) mit Typhuskrankenserum. Als Kontrolle diente Agglutination mit nicht erwärmter Proteus-Bakterienaufschwemmung. Es erwies sich, daß Proteuskultur 105, 1 Std. bei 60° erwärmt, mit Serum 105 bis zur selben Verdünnung wie nicht erwärmte Bakterien agglutiniert; 2) Bakterien, 1 Std. bei 80° erwärmt, mit Serum 105 bis zum Titer agglutinieren, die Agglutination aber ist doch schwächer, denn die charakteristischen Flocken sind nur mittels Lupe zu sehen; 3) Proteus-Kultur, 1 Std. bei 90°, und 15 Min. bei 100° erwärmt, mit Serum 105 nur in den schwächsten Verdünnungen agglutiniert. Auf dieselbe Weise agglutiniert auch mit Pferdetyphusserum und Typhuskrankenserum die bei verschiedenen Temperaturen erhitzte Proteus-Kultur 105. Die Serumherkunft hatte in dieser Hinsicht keinen Unterschied bedingt.

In einer früheren Arbeit habe ich oft gesehen, daß ziemlich oft die Sera von Fleckfieberkranken, welche die Weil-Felixsche Reaktion gaben, gleichzeitig auch TyBa agglutinieren. Viele Forscher (Weil u. Späth, Kaup, Habelin, Paneth, Weltman, Reichenstein, Weil und Felix) haben dasselbe Phänomen beobachtet. Einige dieser Sera habe ich mittels der Castellanischen Absorptionsprobe untersucht. In allen Fällen erwies sich, daß ein Serum, welches mit TyBa absorbiert war, ohne Unterschied Proteus X19 agglutiniert, und mit Proteus X 19 die TyBa absorbiert, ohne irgendwelche Veränderung agglutiniert. Das bedeutet, daß Paragglutination der einen oder anderen Bakterien ausgeschlossen ist. Deshalb hielt ich mich berechtigt, anzunehmen, daß wir es mit Mischinfektionen von Typhus abdominalis und Fleckfieber zu tun haben. 1 Jahr später, als ich mit dem gleichen Material arbeitete, habe ich wieder dasselbe Phänomen beobachtet, diesmal aber konnte ich feststellen, daß Serum von Fleckfieberkranken ziemlich oft TyBa agglutiniert. Von 800 Seris, welche Proteus X19 agglutinierten, agglutinierten 110 auch gleichzeitig TyBa. Es schien mir unwahrscheinlich, daß es sich bei so einem großen Prozentsatz um Mischinfektion handele, denn in derselben Zeit

gab es sehr viel Fälle von Fleckfieber, dagegen war Typhus relativ selten. Da aber doch Mischinfektion nicht ausgeschlossen war, habe ich die Kranken gründlich auf Typhus abdominalis untersucht und zu diesem Zwecke einige Male Agglutination mit TyBa und Proteus X19 ausgeführt und folgende Untersuchungen vorgenommen:

1) Blutaussaat in der Frühzeit der Krankheit; 2) mehrfache Fäzes- und Harnuntersuchungen auf TyBa; 3) Zählung der weißen Blutkörperchen und die Leukozytenformel; 4) Untersuchung des Sektionsmaterials bei tödlichem Ausgang.

Die Blutkulturen bei 10 Kranken, Fäzes- und Harnuntersuchungen (39 bei 23 Kranken) gaben negative Resultate, und auch die morphologischen Untersuchungen sprachen gegen Typhus abdominalis. Auch bei den Sektionen war in 3 Fällen kein Typhus abdominalis wahrzunehmen.

Diese Untersuchungen und das klinische Bild berechtigen uns, in vielen Fällen Typhus abdominalis auszuschließen, obwohl das Serum der Kranken TyBa agglutinierte. Es blieb noch die eine Möglichkeit, daß die Kranken vor kurzem Typhus abdominalis überstanden haben, und daß die während der Krankheit erworbenen Antikörper bei dem zweiten Reiz (Flecktyphus) wieder auftraten. Es hätte also ganz zufällig ein und dasselbe Serum die Widalsche und Weil-Felixsche Reaktion gegeben. In diesem Falle aber hätte der Agglutinationstiter gegen TyBa bei wiederholten Blutuntersuchungen sich nicht geändert, sondern wäre höchstens etwas kleiner geworden. In der Tat aber unterliegt der Serumtiter beträchtlichen Aenderungen, die, wie ich schon in einer Reihe von Fällen feststellen konnte, parallel mit dem Serumtiter des Proteus X19 gehen (Tab. V).

Tabelle V.

Agglutination mit		Tag der Krankheit
TyBa	Proteus X19	
1. Fall		
1:200 +	1:200 +	8.
1:1000 ++	1:1000 ++	15.
1:200 +	1:200 +	21.
2. Fall		
1:50 —	1:100 —	4.
1:50 —	1:200 +	7.
1:1000 +++	1:1000 +++	13.

Man hat den Eindruck, daß ein Zusammenhang zwischen beiden Reaktionen existiert. Weil und Felix sind der Meinung, daß bei Kranken, die früher Typhus abdominalis überstanden haben oder gegen Typhus abdominalis prophylaktisch geimpft worden sind, das Fleckfieber nur als ein unspezifischer Reiz zu betrachten ist. Einen solchen Fall zu beobachten hatte ich Gelegenheit. Der Kranke überstand Typhus abdominalis und gleich darauf Fleckfieber (Tab. VI).

Tabelle VI.

Agglutination mit TyBa	Agglutination mit Proteus X 19	Tag der Krankheit	Bemerkungen
1:50 —	1:50 —	5.	Typhus abdominalis
1:200 +	1:50 —	22.	
1:1000 +	1:50 —	26.	
1:50 +	1:200 +	50.	Fleckfieber
1:50 +	1:1000 +	54.	

Wie aus der beigegebenen Tabelle zu ersehen ist, agglutinierte das Krankenserum TyBa im Verlaufe des Typhus abdominalis sehr hoch, sank aber fast zur Norm nach überstandener Krankheit und blieb auf diesem Punkte stehen, obwohl die Person an Fleckfieber erkrankte und deutliche Weil-Felix-sche Reaktion gab. In einem anderen Falle war wieder bei einem Fleckfieberkranken schwache Widalsche Reaktion (1/50) zu beobachten, wahrscheinlich nach einem früher überstandenen Typhus abdominalis. Die Reaktion blieb während der Krankheit unverändert, obwohl die Weil-Felixsche Reaktion regelmäßig verlief. Diese Fälle würden gegen die Annahme von Weil und Felix sprechen.

Da die Typhusreaktion ziemlich oft bei Fleckfieberkranken auftritt, entstand die Frage, ob es möglich sei, einen Unterschied zwischen der Widalschen Reaktion, die sich im Verlaufe des Typhus abdominalis entwickelt, und der Typhusagglutination, welche nicht selten bei Fleckfieber oder anderen Krankheiten, wie Tuberkulose, vorkommt, zu finden. Wie schon erwähnt, versagte diesmal die Castellanische Absorptionsprobe, denn wir haben es hier nicht mit Mitagglutination zu tun. Als ich die Agglutination mit Fleckfieber- und Typhuskrankenseris ausführte, habe ich beobachtet, daß Sera, welche gleichzeitig TyBa Proteus X19 agglutinieren, nur 2 Sera, d. h. 10 Proz., auch Proteus 105 nicht agglutinieren (Tab. VII).

Tabelle VII.

Nr.	Agglutination mit TyBa	Agglutination mit Proteus X19	Agglutination mit Proteus 105
1	1:200 +	1:100 +	1:100 —
2	1:1000 +	1:1000 +	1:200 +
3	1:100 +	1:200 +	1:100 —
4	1:200 +	1:1000 +	1:100 —
5	1:200 +	1:1000 +	1:100 —
6	1:200 +	1:1000 +	1:100 ±
7	1:1000 +	1:1000 +	1:100 —
8	1:200 +	1:200 +	1:100 —
9	1:200 +	1:100 +	1:100 —
10	1:1000 +	1:1000 +++	1:100 —
11	1:1000 +	1:1000 +	1:100 —
12	1:200 +	1:1000 +	1:100 —
13	1:1000 +	1:1000 +++	1:100 —
14	1:1000 +	1:1000 ++	1:100 —
15	1:200 +	1:1000 +	1:100 —
16	1:200 +	1:1000 +	1:100 ±
17	1:200 +	1:200 +	1:100 —
18	1:200 +	1:200 +	1:100 —
19	1:1000 +++	1:1000 +	1:100 —
20	1:200 +++	1:200 +	1:200 +

Wir sehen also von 20 Seren, welche gleichzeitig TyBa und Proteus X19 agglutinieren, nur 2 Sera, d. h. 10 Proz., auch Proteus 105 agglutinieren. Dagegen agglutinieren, wie ich gezeigt habe. 93 Proz. Typhuskrankensera den Proteus 105. Wahrscheinlich ist es mittels dieser Reaktion möglich, in vielen Fällen, wo gleichzeitig die Widalsche und die Weil-Felixschen Reaktionen auftreten, den Typhus abdominalis auszuschließen, was noch durch Untersuchungen an größerem Material zu bestätigen wäre.

Aus den Untersuchungen folgt, daß sowohl Immun- wie Krankensera den Proteus 105 neben TyBa agglutinieren. Da eine Reihe von Seren (Fleckfieber), welche gleichzeitig TyBa und Proteus X 19 agglutinieren, den Proteus 105 nicht zusammenballen, so wäre dies hier ein serologischer Beweis, daß wir es im größten Teile dieser Fälle nur mit Fleckfieber zu tun haben. Die Agglutination mit TyBa während des Fleckfiebers ist demnach ganz verschieden von der, welche unter dem direkten Einflusse der Typhusbazillen zustande kommt, da sie mit Proteus 105 nicht gleichzeitig auftritt.

Zusammenfassung.

Verf. hat 2 identische Stämme (Proteus vulgaris) gezüchtet. Der 1. Stamm 177 stammt aus den Fäzes einer Kranken mit Cholerasymptomen (Cholera nostras), der 2. Stamm 105 aus dem Wasser der Weichsel. Beide Stämme agglutinieren nur mit Typhusserum. Die Komplementbindung ist positiv, Präzipitation negativ.

Von anderen serologischen Reaktionen ist nur die Komplementablenkung mit Typhusserum zu erwähnen, die Präzipitation ist negativ. Die Castellanischen Absorptionsproben haben gezeigt, daß Typhusserum nach Absorption mit TyBa Proteus 105 nicht agglutiniert, dagegen nach Absorption mit Proteus 105 agglutiniert das Typhusserum mit TyBa so wie vor Absorption. Immunserum 105 agglutiniert TyBa nicht, Widalpositive Typhuskrankensera agglutinieren auch (in 92 Proz.) den Proteus 105, dagegen das Normalserum und Serum bei anderen Infektionskrankheiten, wie Fleckfieberserum agglutinieren den Proteus 105 nicht.

Was den Titer der Typhuskrankensera, welche gleichzeitig TyBa und Proteus 105 agglutinieren, anbetrifft, so agglutiniert a) ungefähr die Hälfte der Sera im selben Grade die TyBa und Proteus 105, b) ca. $^1/_4$ der Sera die TyBa höher als Proteus 105, c) dagegen $^1/_4$ die paragglutinierenden Bakterien höher als die spezifischen. Die Agglutination mit TyBa und Proteus 105 tritt nicht immer im Krankenblute gleichzeitig auf. Das Serum der prophylaktisch gegen Typhus geimpften Personen, welches TyBa agglutiniert, ballt auch Proteus 105 zusammen.

Das Erhitzen der Sera, welche gleichzeitig TyBa und Proteus 105 zusammenballen, hat folgenden Einfluß: a) Typhuskrankenserum,

welches TyBa und Proteus 105 zusammenballt, agglutiniert, 1 Std. auf 60° C erwärmt, die ProteusBa 105 sowie das nicht erwärmte Serum, dagegen nicht die TyBa. — b) Pferdetyphusimmunserum, welches gleichzeitig TyBa und Proteus 105 zusammenballt, hat, 1 Std. auf 60° C erwärmt, das entgegengesetzte Verhalten, und zwar agglutiniert es die TyBa so wie nicht erwärmtes Serum, dagegen Proteus 105 sehr schwach.

Sera von Fleckfieberkranken, welche TyBa agglutinieren (ca. 5—10 Proz.), ballen den Proteus 105 nicht, während fast alle Typhuskrankensera sowie Sera prophylaktisch gegen Typhus geimpfter Personen gleichzeitig Proteus 105 agglutinieren.

Nachdruck verboten.

Die Schleimwälle der Paratyphus B-Kolonien.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Köln.]

Von Prof. Dr. **Reiner Müller.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Schleimwälle bei Paratyphus B-Kolonien sind bald nach der Bekanntgabe dieser Bakterien durch Schottmüller (1900) beobachtet worden. Ueber die Bedeutung dieser Schleimringe als diagnostisch wertvolles Kulturmerkmal herrschte in den ersten Jahren Unklarheit. Eine solche herrscht auch heute anscheinend noch bei manchem Bakteriologen, obwohl besonders Ludwig Bitter sich in den letzten Jahren bemüht hat, die darüber für Kenner feststehenden Tatsachen zum Allgemeingut zu machen.

1) Ich habe 1910 auf die Konstanz der Schleimwallbildung als praktisch wichtigsten Kulturunterschied zwischen den bei typhösen Erkrankungen gefundenen Schottmüllerschen Paratyphus B-Bakterien und den bei enteritisartig verlaufenden Erkrankungen vorkommenden Breslau-Aertrycke-Bakterien hingewiesen, und festgestellt, daß die erste Bedingung für ihre Entstehung der Wechsel der Bruttemperatur von 37° zu Zimmerwärme ist. Der schleimige Teil der Kolonie ist derjenige, der bei niedrigen Wärmegraden gewachsen ist. Eine Einzelkolonie, die nicht erst bei 37°, sondern nur bei 18—20° wächst, bildet auch auf Agarnährboden eine einheitliche, schleimtropfenartige Kolonie; entsprechend dem „Rutschen", also dem Herabfließen dieser schleimigen Kultur auf Schräggelatine, einem Nährboden, der für die Unterscheidung der Paratyphus B- und der Breslauer Fleischvergifter sehr empfehlenswert ist (vgl. Absatz 4).

2) Daß die Schleimwälle sich nur bilden bei Einzelkolonien, wenn genügend unbewachsener und nicht zu dünner Nährböden in der Umgebung vorhanden ist, ist bekannt. Das hier beigegebene Bild zeigt dies ja auch.

Im Nachfolgenden möchte ich nun auf zwei weitere Vorbedingungen hinweisen, die für einwandfreie Ergebnisse nicht übersehen werden dürfen: Das Alter der Kulturen und die Zusammensetzung des Nährbodens.

3) Das Alter der untersuchten Kulturen ist meines Erachtens neben dem Nichtbeachten des nötigen Wechsels der Temperatur der Hauptgrund gewesen, warum es Hübener, Trautmann, Kutscher und Meinicke u. a. vor etwa 2 Jahrzehnten nicht gelungen ist, zu erkennen, unter welchen Voraussetzungen die Schleimwälle sich bilden.

Ich habe dies ebenfalls zwar schon 1910 aufgeklärt, auch 1912 Abbildungen von Mutationsformen gegeben, die in älteren Kulturen auftreten. Da ich aber, bis in die letzte Zeit, mehrmals um Ueber-

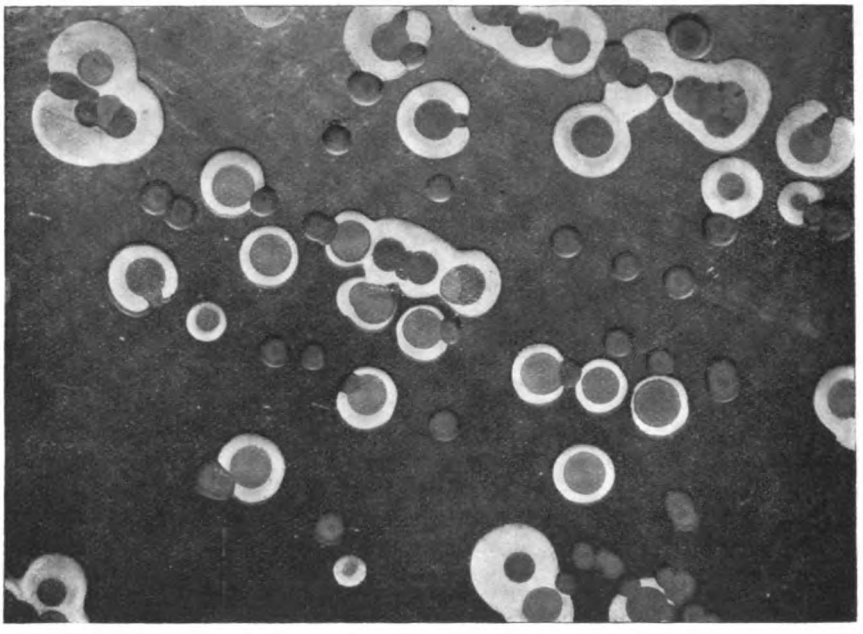


Fig. 1.

lassung von Sammlungskulturen der Paratyphusgruppe für solche Untersuchungen gebeten worden bin, soll die Abbildung zeigen, wie wenig ältere Paratyphuskulturen zur Erforschung von Kulturmerkmalen geeignet sind, wenn man sie nicht persönlich immer wieder von Einzelkolonien, unter Ausschaltung aufgetretener Mutanten, weiter züchtet. Das Bild ist eine Photographie in doppelter Größe einer Reinkultur auf einfachem Nähragar von einem 3 Jahre vorher aus einem typhös erkrankten Menschen gezüchteten Paratyphus B-Bakterium. Das Lichtbild ist aufgenommen bei schräg von hinten auffallender Beleuchtung, also auf dunklem Untergrunde, wie man ja auch im Laboratorium die Schleimwälle am besten betrachtet; es ist weder retouchiert noch verstärkt. Die Kolonien waren zur Zeit der photographischen Aufnahme 2 Tage lang bei 36°, dann 4 Tage bei Zimmerwärme

(etwa 18°) gewachsen. Sie zeigen nicht etwa besonders schön geratene Wälle, sondern ein bei guten Kulturbedingungen normales Wachstum. Die Kultur ist abgeimpft von einer Reinkultur auf Schrägagar, die ich persönlich 2 Jahre vorher von einer sicher reinen, schleimwallbildenden Einzelkolonie angelegt und mit einem in Paraffin getauchten Wattepfropfen verschlossen hatte. (Ich habe bei solchem Verschluß Typhus- und Paratyphuskulturen mehrfach länger als 10 Jahre ohne Ueberimpfung am Leben erhalten.) Die 2 Hauptgruppen der gewachsenen Kolonien sind so verschieden, daß in einer Zeit, ehe derartige Bakterienmutationen erforscht waren, wohl jeder Bakteriologe sie für 2 verschiedene Spezies erklärt haben würde. Aber sowohl die Bakterien der schleimumwallten, als auch die der wallfreien Kolonien wurden von einem von mir mit einem schleimwallbildenden Stamme hergestellten Serum gleich hoch, bis zum Endtiter agglutiniert; und sie wiesen alle übrigen Merkmale der Paratyphusgruppe auf. Ferner trat eine solche Abspaltung von Bakterien, deren Kolonien keine Schleimwälle bilden, bei allen schleimwallbidenden Paratyphus B-Reinkulturen auf; ich habe mehr als 100 Stämme daraufhin untersucht. Bei Reinkulturen auf Schrägagar oder Schräggelatine läßt sich der Beginn dieser Abspaltung im allgemeinen schon nach zweimonatigem Aufenthalt bei Zimmerwärme nachweisen. In alten Kulturen können schließlich die nicht wallbildenden die Oberhand gewinnen; aber auch aus mehrjährigen nicht überimpften Schrägagarröhrchen habe ich fast ausnahmslos noch einzelne Kolonien mit typischer Wallbildung züchten können. Wenn ich von den nicht wallbildenden Kolonien Reinkulturen anlegte, fand ich (bei über 50 Versuchen) auch bei mehrjähriger Weiterzüchtung keinen Rückschlag in die bei Zimmerwärme schleimig wachsende Form. Wenn ich umgekehrt beim Auftreten der nicht wallbildenden Kolonien immer wieder nur von einer schleimwallbildenden Kolonie weiterimpfte, blieb die Wallbildung, und zwar jetzt schon fast 20 Jahre lang, in den Reinkulturen erhalten. Auch in solchen, vor langer Zeit vom menschlichen Körper isolierten Kulturen trat die Abspaltung der wallfreien Form nicht schneller auf als in jungen. Das Bild zeigt des weiteren, daß unter den wallbildenden Kolonien selbst noch Verschiedenheiten entstanden sind, bestehend in verschiedener Helligkeit des Zentrums; die in der Mitte helleren Kolonien haben etwas schwächere Wallbildung. Für diese Helligkeitsunterschiede ist eine nichtorthochromatische photographische Platte empfindlicher als das Auge. Alte Paratyphuskulturen sind deshalb nur mit großer Vorsicht bei der Prüfung der Schleimwallbildung und anderer Kulturmerkmale zu benutzen. Solche Sammlungskulturen können irreführen, wenn jemand beim Weiterzüchten von einer, beim 37°-Wachstum nicht unterscheidbaren, mutierten Einzelkolonie abgeimpft hat. Dagegen bleibt bei jungen Kulturen, also insbesondere in Untersuchungsämtern, die Wallbildung das bequemste und sicherste Kulturmerkmal der echten Paratyphus B-Bakterien, im Gegensatz zu den nahezu gleich agglutinierbaren Fleischvergiftern des Breslau-Aertrycke-Typus. Ich habe bei mehreren Hunderten Paratyphus B-Fällen niemals gefunden, daß schon bei der Isolierung aus dem Menschen neben den schleimwallbildenden Kolonien auch noch nichtschleimwallbildende Paratyphuskolonien gewachsen wären.

4) Eine vierte Voraussetzung für regelrechte Wallbildung der Paratyphus B-Kolonien ist die richtige Zusammensetzung der

Nährböden. In meinen früheren Arbeiten bin ich darauf nicht eingegangen, weil mir das damals selbstverständlich erschien. Die Not der Zeit hat aber inzwischen viele Laboratorien gezwungen, statt der klassischen Nährböden Robert Kochs, nämlich mit Fleischwasser und Witte-Pepton, Ersatznährböden mit Fleischextrakten verschiedener Herkunft, mit Plazenta-Abkochungen und mannigfaltigen Peptonarten anzustellen. Auf solchen Ersatznährböden ist die Wallbildung oft recht kümmerlich, z. B. auf einfachem Plazenta-Agar. Man kann dann allerdings durch Zusatz von Traubenzucker und Phosphaten die Wallbildung bessern; jedoch wird die Ueppigkeit der Wälle auch dann auf Fleischwasser-Wittepepton-Nährboden meist nicht erreicht; ich verwende daher im Kölner Untersuchungsamt wieder die altbewährten Robert Kochschen Nährböden.

Unter den Arbeiten, die eine Trennung der Paratyphus B-Bakterien und der Fleischvergifter vom Typus Breslau-Aertrycke für nicht durchführbar erachten, vermisse ich eine sorgfältige Nachprüfung der Kulturunterschiede unter den von mir 1910 angegebenen Gesichtspunkten. Eine solche Nachprüfung kann wohl in jedem bakteriologischen Untersuchungsamte so angestellt werden, daß man mehrere Jahre lang einige Hunderte aus dem Menschen isolierte Stämme der Paratyphusgruppe in der angegebenen Weise untersucht. Dann dürfte sich wohl für ganz Deutschland und darüber hinaus ergeben, daß 1) die durch die schleimwallbildenden Paratyphus B-Bakterien erzeugten Erkrankungen häufiger sind, als die durch die schleimwallfreien Breslauer Fleischvergifter, wenn letztere auch gelegentlich Massenerkrankungen hervorrufen. 2) Daß epidemiologisch die Erkrankungen mit schleimwallbildenden Paratyphus B-Bakterien ebensowenig wie die mit Eberth-Gaffkyschen Typhusbakterien auf Genuß von Fleisch erkrankter Tiere zurückzuführen sind, während dies bei den Breslaubakterien ebenso wie bei den schleimwallbildenden Gärtner-Bakterien die Regel ist. 3) Daß von einer Ubiquität der schleimwallbildenden Paratyphus B-Bakterien ebensowenig die Rede sein kann wie bei den Typhusbakterien. 4) Daß den beiden Bakterientypen, den schleimwallbildenden Paratyphus B-Bakterien und den schleimwallfreien Breslau-Aertrycke-Bakterien, zwei durchweg recht verschiedene klinische Krankheitsbilder entsprechen. Daß klinische Bilder in seltenen Fällen atypisch sein können, bedarf eigentlich keiner Erörterung; man denke an das Auftreten von Paratyphusbakterien als Eitererregern.

Auf die Unterscheidbarkeit der beiden Bakterien in der Agglutininbildung, durch die Raffinosereaktion und durch den Tierversuch will ich hier nicht eingehen; ich habe in dieser Beziehung keine anderen Angaben zu machen als 1910 und 1914. Natürlich sind auch für diese Proben alte Sammlungskulturen nicht maßgebend. Wenn die schleimwallbildenden Paratyphus B-Bakterien in ihrer Agglutinierbarkeit eine große Aehnlichkeit, wenn auch nicht völlige Gleichheit zeigen mit den Breslauer Fleischvergiftern, so bleibt es doch ein nur durch die faszinierende Wirkung des Wortes „spezifisch" erklärlicher Verstoß gegen die Logik, aus diesem Uebereinstimmen eines Merkmals zu folgern, daß diese Bakterien auch in ihren anderen Merkmalen und Eigenschaften übereinstimmen müßten; wir wissen ja jetzt, daß bei Maltafieber-Rinderabortus, Mäuseseptikämie-Schweinerotlauf, Hühnertyphus-Menschentyphus, trotz gleicher Agglutination, die Pathogenität und Epidemiologie erhebliche Unterschiede zeigen. Ebenso sind bei den Para-

typhus B-Bakterien und den Fleischvergiftern vom Typus Breslau-Aertrycke trotz ähnlicher Agglutination die Kolonienform und die Pathogenität recht verschieden.

Wenn also ein Untersuchungsamt sich damit begnügt, die aus den Blut- oder Stuhlproben gewachsenen, verdächtig aussehenden Kolonien nur in einer „bunten Reihe" biochemisch, und mit agglutinierendem Serum zu untersuchen, so darf es nicht den Anspruch erheben, daß es eine dem Stande der bakteriologischen Wissenschaft entsprechende, genügend genaue Diagnose innerhalb der Paratyphusgruppe fertig gebracht habe. Ein solcher Untersucher darf aber dann auch nicht das Recht beanspruchen, über die Unterscheidbarkeit der Paratyphus B-Bakterien von Fleischvergiftern des Typus Breslau-Aertrycke ein maßgebendes Urteil abzugeben, selbst wenn er tausende Stämme in Händen gehabt hat.

Meine früheren Arbeiten über Bakterienmutationen dürften mir den Vorwurf ersparen, ich berücksichtige nicht genügend die Veränderlichkeit innerhalb der Paratyphusgruppe. Wenn auch, wie das beigegebene Bild ja gerade zeigen soll, die Eigenschaft der Schleimwallbildung in alten Kulturen mutationsartig verloren gehen kann, so ändert diese Tatsache nichts an der anderen Tatsache, daß ich diese Schleimwallbildung in 22 Jahren noch niemals bei Fleischvergiftern gefunden habe, die nicht Gärtner-Bakterien waren. Wenn Bitter 1922 angibt, daß er einmal einen solchen Stamm gefunden habe, so bedeutet das gegen die Brauchbarkeit dieses Kulturmerkmals ebensowenig, wie das seltene Vorkommen von sonst typischen Paratyphus B-Bakterien, die aus Traubenzucker nicht Gas bilden, die Gasbildungsproben wertlos macht.

Daß innerhalb der Typhus-Paratyphus-Coli-Gruppe in Kulturen weitgehende Bakterienmutationen auftreten können, bezweifle ich nicht; wenn ich es auch psychologisch verständlich finde, daß angesehenen Forschern, die sich mit dem Suchen nach solchen Mutationen nicht jahrelang beschäftigt haben, derartige Dinge „erstaunlich" und als nicht exakt bewiesen erscheinen können. Wir wissen aber über die Ursachen derartiger Veränderungen zu wenig und können daher die meisten nicht beliebig experimentell erzeugen. Zur Vermeidung von Mißverständnissen möchte ich aber hervorheben, daß ich meine Mitteilung von 1911 über das Vorkommen mehrerer Tochterkolonien schleimwallbildender Paratyphus B-Bakterien in zwei Kolonien Eberth-Gaffkyscher Typhusbakterien nicht als Hypothese betrachte, sondern es war die einfache Mitteilung einer tatsächlichen, vorher mehreren Bakteriologen gezeigten und sorgfältig ausgeprüften Beobachtung; ich habe es damals absichtlich vermieden, epidemiologische Folgerungen daraus abzuleiten. Ganz abgesehen von dieser Beobachtung und dem mehrfach sichergestellten gleichzeitigen Vorkommen von Typhusbakterien und schleimwallbildenden Paratyphus B-Bakterien im Blute typhös erkrankter Menschen sprechen aber meine bakteriologischen Untersuchungserfahrungen seit 1903 eindeutig dafür, daß unter natürlichen Verhältnissen kein regelloses Hin- und Hermutieren erfolgt, sondern, daß zwar die Infektionen mit den nicht schleimwallbildenden Fleischvergiftern vom Typus Breslau-Aertrycke auf Fleisch erkrankter Tiere zurückzuführen sind, daß dagegen die Infektionen mit schleimwallbildenden Paratyphus B-Bakterien sich regelmäßig in ihrer Epidemiologie nicht nennenswert unterscheiden von den Infektionen mit den Eberth-

Gaffkyschen Typhusbakterien. Im Gegensatz zu den in E. Hübeners Buch verfochtenen Ansichten der Uhlenhuthschen Schule muß die Bekämpfung der durch schleimwallbildende Paratyphus B-Bakterien hervorgerufenen Infektionen gleich sein derjenigen des Typhus abdominalis.

Bei Bacterium coli kann unter Bakteriophageneinwirkung ein Schleimigwerden mutationsartig auftreten. Die Möglichkeit, bei Typhusbakterien oder bei nichtschleimwallbildenden Bakterien der Paratyphusgruppe durch Bakteriophagen schleimwallbildende Mutanten zu erzielen, ist noch nicht genügend geprüft.

Zusammenfassung: Die Schleimwallbildung der Paratyphus B-Bakterien im Gegensatz zu den Fleischvergiftern des Typus Breslau-Aertrycke ist ein bequemes, deutliches, zur genauen epidemiologischen Diagnosenstellung gehörendes Kulturmerkmal, das regelmäßig auftritt bei Einzelkolonien junger Kulturen auf Nährböden mit Fleischwasser und Witte-Pepton. In alten Paratyphus B-Kulturen treten mutationsartig Bakterien ohne Wallbildung regelmäßig auf.

Literatur.

Bitter, Ludwig, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88; Dtsch. med. Woch. 1925. S. 226. — Hübener, E., Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen. Jena 1910. — Müller, Reiner, Dtsch. med. Woch. 1910. S. 2387; Münch. med. Woch. 1911. S. 2247; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 50. 1911. Beiheft. S. 141*. Ztschr. f. indukt. Abstammungs- u. Vererbungsl. Bd. 8. 1912. S. 305; Münch. med. Woch. 1914. S. 471.

Nachdruck verboten.

Ueber von Hogcholerabazillen einerseits, von Paratyphus A-Bazillen andererseits schwer differenzierbare, in Japan vorkommende Paratyphusbazillen.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität zu Sendai (Direktor: Prof. Dr. K. Aoki).]

Von Prof. Dr. **K. Aoki** und Dr. **K. Sakai.**

Während des Weltkrieges wurden merkwürdige Bakterien von der deutschen Armee einerseits, von der englischen anderseits bei solchen Kranken nachgewiesen, welche entweder septikämische, typhöse oder dysenterische Symptome zeigten. Die Mikroben scheinen in der Türkei, in Kleinasien und Südrußland überall verbreitet zu sein, weil sie in diesen Gegenden sowohl bei den Eingeborenen, als auch bei Europäern, welche sich damals als Soldaten dort aufhielten, nachgewiesen wurden. Die Forscher, welche sich an der Entdeckung dieser Mikroben beteiligten, waren Neukirch, Weil, Saxl, Mac Adam, Hirschfeld u. a. Diese Mikroben wurden von Weil Paratyphus β, von Hirschfeld Paratyphus C genannt. Die Eigentümlichkeit dieser Mikroorganis-

men besteht darin, daß sie sowohl zu Hogcholerabazillen, B. suipestifer, als auch zu Paratyphus B nahe agglutinatorische Beziehung zeigen. Besonders scheinen sie ersteren Bakterien näher verwandt zu sein, weil Neukirch sie von B. suipestifer einerseits, Tenbroeck von Hogcholerabazillen anderseits kaum unterscheiden konnte. Durch genauere Untersuchungen von Andrews und Neave wurde jedoch festgestellt, daß sie Hogcholerabazillen sehr nahe verwandt, aber nicht mit ihnen identisch sind.

Unsere Paratyphusbazillen, über welche wir hier berichten, wurden immer bei typhös erkrankten Menschen, entweder im Blute oder Kot und Harn nachgewiesen. Es waren im ganzen 6 Stämme, nämlich Pal Ujiie, Hitomi, Miya, Saizawa und Kikuchi. Diese einzelnen Stämme wurden schon von Ikegami, Shoji, Murakami und Tazawa publiziert.

Sie sind morphologisch und kulturell von Paratyphus A nicht zu unterscheiden. Wenn man sie agglutinatorisch in unseren verschiedenen repräsentierenden Seris, womit wir immer Bakterien der Paratyphusgruppe zu diagnostizieren pflegen, untersucht, so findet man merkwürdigerweise, daß sie in den Seren verschiedener Arten sehr stark beeinflußt werden können. Dieser Sera waren es im ganzen 14, nämlich 1 Typhus, 1 Paratyphus A, 2 Paratyphus B, 2 Mäusetyphus, 2 Gärtner, 2 Hogcholera, 2 Abortus equi, 1 Hühnertyphus und 1 Faecalis alcaligenes. Hier muß bemerkt werden, daß das eine der 2 Paratyphus B-Sera, nämlich P. B. 37, so dargestellt war, daß es Mäusetyphusbazillen fast gar nicht agglutinierte, wogegen das andere Serum Mäusetyphusbazillen fast bis zum Titer agglutinieren konnte. Ebenfalls waren 2 Mäusetyphussera so dargestellt, daß das eine, nämlich Ms 34, alle Mäusetyphusbazillen bis zum Titer, Parathyphus B-Bazillen aber nicht, und das andere auch Paratyphus B-Bazillen fast bis zum Titer agglutinieren konnte.

Es ergab sich nämlich, daß sie in Typhusserum, dessen Titer 10000 stark war, 1:2000, in Paratyphus B-Serum, P. B. 9, dessen Titer 1:20000 stark war, 1:2000, in Mäusetyphusserum, Ms 5, dessen Titer ebenfalls 1:20000 stark war, 1:2000 stark beeinflußt wurden. Doch wurden sie in den anderen Seris der Paratyphus B- und Mäusetyphusbazillen, nämlich P. B. 37 und Ms. 34, sehr schwach agglutiniert. Ebenso wurden sie in Seren von B. abortus equi und B. faecalis nicht beeinflußt. In einem Serum von Gärtner wurden sie ferner auch nicht, aber in einem anderen Serum ziemlich stark agglutiniert. Sie wurden aber merkwürdigerweise sowohl vom Serum der Hogcholerabazillen, als auch von dem des Paratyphus A und des Hühnertyphus bis zum Titer agglutiniert. Dieser Versuch wurde mit vielen Stämmen ausgeführt. Tabelle I zeigt die Resultate.

Da diese Mikroben einerseits im Paratyphus A-Serum, andererseits im Hogcholeraserum bis zum Titer agglutiniert worden waren, wurden Stämme von Paratyphus A und Hogcholerabazillen in denselben Seris agglutinatorisch untersucht, worin unsere Bakterien geprüft worden waren, um sie mit unseren Bakterien zu vergleichen. Wie aus Tabelle II ersichtlich, wurden die Stämme von Hogcholerabazillen im großen und ganzen fast im gleichen Verhältnis wie unsere Bakterien darin agglutiniert. Als einziger, doch deutlicher Unterschied wurde aber festgestellt, daß sie im Paratyphus A-Serum und Hühnertyphusserum im Gegensatz zu unseren Bakterien fast nicht beeinflußt wurden.

Tabelle I.

Name der Immunsera	Ty. 39	Ht. 1	Ab. eq. 1	Ab. eq. 3	P.A. 1	P.A. 8	Hg. ch. 2	Hg. ch. 7	P.B. 9	P.B. 37	Ms. 5	Ms. 34	E.G. 3	E.G. 18	Fäc. 1
Name der Bakterien / Titer	10 000	2000	20 000	5000	20 000	10 000	100 000	10 000	20 000	10 000	20 000	10 000	10 000	10 000	20 000
P.A. 1	2000	1000	100 —	100 —	20 000	10 000	50 000	5000	2000	200	2000	200	100 —	500 ±	100 —
Ujiie	2000	1000	100 —	100 —	20 000	5 000	50 000	5000	2000	200	2000	200	100 —	500 ±	100 —
Hitomi	2000	1000	100 —	100 —	20 000	5 000	50 000	5000	2000	200	2000	200	100 —	500 ±	100 —
Miya	2000	1000	100 —	100 —	20 000	5 000	50 000	5000	2000	200	2000	200	100 —	500 ±	100 —
Saizawa	1000	1000	100 —	100 —	20 000	5 000	50 000	5000	2000	200	2000	200	100 —	500 ±	100 —
Kikuchi	2000 ±	1000	100 —	100 —	20 000	10 000	50 000	5000	2000	200	2000	200	100 —	500 ±	100 —

Tabelle II.

Name der Immunsera	Ty. 39	Ht. 1	Ab. eq. 1	Ab. eq. 3	P.A. 1	P.A. 8	Hg. ch. 2	Hg. ch. 7	P.B. 9	P.B. 37	Ms. 5	Ms. 34	E.G. 3	E.G. 18	Fäc. 1
Name der Bakterien / Titer	10 000	2000	20 000	5000	20 000	10 000	100 000	10 000	20 000	10 000	20 000	10 000	10 000	10 000	20 000
Hg. ch. 1	100 —	100 —	100 —	100 —	10 000	100 —	100 000	10 000	2000	500	5000	200	100 —	100 —	100 —
Hg. ch. 2	100 —	100 —	100 —	100 —	10 000	100 —	100 000	10 000	2000	200	2000	100	100 —	100 —	100 —
Hg. ch. 3	100 —	100 —	100 —	100 —	10 000	100 —	100 000	10 000	2000	100	1000	100 ±	100 —	100 —	100 —
Hg. ch. 6	100 —	100 —	100 —	100 —	10 000	100 —	100 000	10 000	2000	500 ±	1000	100	100 —	100 —	100 —
Hg. ch. 7	100 —	100 —	100 —	100 —	10 000	100 —	100 000	10 000	2000	500	2000	100	100 —	100 —	100 —
P.A. 2	100 —	100 —	100 —	100 —	2 000	10 000	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —
P.A. 3	100 —	100 —	100 —	100 —	2 000	10 000	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —
P.A. 4	100 —	100 —	100 —	100 —	2 000	10 000	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —
P.A. 7	100 —	100 —	100 —	100 —	2 000	10 000	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —
P.A. 8	100 —	100 —	100 —	100 —	2 000	10 000	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —	100 —

Wenn auch nur noch in schwachem Grade, fand man dasselbe Verhalten beim Gärtner-Serum. Dagegen wurden Stämme von Paratyphus A-Bazillen in denselben Seren bis auf die eigenen nicht agglutiniert. Durch dieses Resultat wurde klar, daß unsere Bazillen weder mit Hogcholera, noch mit Paratyphus A identisch sind. Um die etwaige verwandtschaftliche Beziehung dieser 3 Arten von Bakterien noch genauer zu untersuchen, wurden Sera mit unseren Bakterien bei Kaninchen hergestellt. In diesen Seren wurden die anderen Bakterienstämme agglutiniert, in deren Sera unsere Bakterien schon agglutinatorisch geprüft worden waren. Es wurde festgestellt, daß Hogcholerabazillen darin in allen Seren ohne Ausnahme fast bis zum Titer, Paratyphus A-Bazillen auch sehr stark, in einigen Sera nämlich bis zum Titer, bei anderen Sera etwas schwächer, Typhusbazillen auch manchmal so stark wie die homologen Bazillen und nächst stark die Gärtner-Bazillen agglutiniert werden. Paratyphus B-Stämme und Mäusetyphusstämme agglutinierten auch deutlich, aber schon viel schwächer (Tabelle III).

Tabelle III.

Name der Immunsera	P.A. 1	Ujiie	Hitomi	Miya	Saizawa	Kikuchi
Name der Bakterien / Titer	20 000	20 000	20 000	10 000	10 000	10 000
P.A. 1	20 000	20 000	20 000	10 000	10 000	10 000
Ty. 39	10 000	10 000	500	500	2 000	1 000
Hg.ch. 1	20 000	10 000	10 000	10 000 ±	10 000 ±	10 000
P.A. 2	20 000	20 000	1 000	1 000 ±	5 000	5 000
P.B. 1	2 000	1 000	1 000	1 000 ±	500	2 000
P.B. 37	500	200	500	500	200 ±	500
Ms. 2	1 000	1 000	500	500 ±	200	1 000
Ms. 34	500	500	200	200	100	100
E.G. 3	5 000	5 000	200	200	1 000	200
E.G. 18	2 000	2 000	50	50	100	100

Um noch genauer zu untersuchen, in welcher Beziehung die 3 Bakterienarten zueinander stehen, wurden folgende Versuche ausgeführt, wodurch man die Identität beider Bakterienarten sehr genau bestimmen kann:

Wie Aoki und Konno schon genau mitgeteilt haben, zeigt der Bruch, dessen Nenner den Titer der Hauptagglutination eines bestimmten Serums, dessen Zähler den Titer seiner Mitagglutination darstellt, eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen den beiden Bakterien, welche dabei agglutiniert wurden. Der Wert dieses Bruches schwankt je nach der verwandtschaftlichen Beziehung der geprüften Bakterienarten manchmal sehr während der Immunisierung, wie wir schon bei der Immunisierung mit verschiedenen Bakterien beobachteten. Wenn sich der Wert des Bruches während der ganzen Immunisierung immer als $^1/_1$ erweist, müssen die beiden Bakterienarten identisch sein. Falls aber die beiden Bakterien ganz different sind, so ist der Wert des Bruches immer kleiner als $^1/_1$. Ja, der Wert des Bruches zeigt sogar während der ganzen Immunisierung eine Schwankung, wie wir sie bei Typhusimmunisierung Paratyphus gegenüber beobachteten.

Aus diesem Grunde immunisierten wir 2 Kaninchen einerseits mit unseren Bakterien, andererseits mit Hogcholera und Paratyphus

A-Bazillen mehrmals. Während der ganzen Immunisierung wurden Blutproben in 7tägigen Intervallen nach jeder Einspritzung entnommen. In diesen Seren wurden diese 3 Bakterienarten agglutiniert. Dabei wurde der Wert des Bruches aus dem dabei festgestellten Agglutinationstiter ausgerechnet und beobachtet, wie oben beschrieben (Tab. IV).

Tabelle IV.

		I	II	III	IV	V	VI	VII
A	Hg.ch. 1 : P.A. 1	500 = 1/2	1000 = 1/2	5000 = 1/2	10 000 = 1/2	20 000 = 1/1	20 000 = 1/1	20 000 = 1/1
	P.A. 1 : Hg. ch. 1	1000 = 1/2	2000 = 1/10	20 000 = 1/5	100 000 = 1/2	100 000 = 1/2	100 000 = 1/1	
B	P.A. 2 : P.A. 1	100 = 1/5	1000 = 1/5	5000 = 1/2	5000 = 1/2	10 000 = 1/2	10 000 = 1/2	20 000 = 1/1
	P.A. 1 : P.A. 2	200 = 1/1	2000 = 1/1	10 000 = 1/1	10 000 = 1/1	10 000 = 1/1	20 000 = 1/1	
C	Ty. 39 : P.A. 1	200 = 1/5	1000 = 1/5	1000 = 1/10	2000 = 1/5	2000 = 1/5	5000 = 1/4	20 000 = 1/2,5
	P.B. 1 : P.A. 1	50 = 1/20	200 = 1/25	500 = 1/20	1000 = 1/10	1000 = 1/10	1000 = 1/10	2000 = 1/10
	Ms. 1 : P.A. 1	100 = 1/10	500 = 1/10	500 = 1/20	500 = 1/20	1000 = 1/10	1000 = 1/10	1000 = 1/20

Es ergab sich, daß der Wert des Bruches bei der Immunisierung mit unseren Bakterien, P. A. 1 Hogcholera (Hg.ch.) gegenüber vom Minimum $^1/_2$ bis zum Maximum $^1/_1$, bei der Immunisierung mit Hogcholerabazillen unseren Bakterien, P. A. 1, gegenüber vom Minimum $^1/_{10}$ bis zum Maximum $^1/_1$ schwankt (Tab. 4 A). Auf die gleiche Weise fiel der Wert des Bruches bei der Immunisierung von Kaninchen mit unseren Bazillen Paratyphus A-Bazillen gegenüber vom Minimum $^1/_5$ bis zum Maximum $^1/_1$, umgekehrt war er bei der Immunisierung mit Paratyphus A-Bazillen unseren Bazillen gegenüber immer $^1/_1$ (Tab. 4 B). Das ist ein Beweis dafür, daß unsere Bazillen mit den beiden Bakterien sehr nahe verwandt, aber nicht identisch sind. Typhus und Paratyphus B gegenüber verhielten sie sich ganz verschieden, so daß der Wert des Bruches während der ganzen Immunisierung mit unseren Bazillen Typhusbazillen gegenüber im Minimum $^1/_{10}$, im Maximum $^1/_2$; Paratyphus B-Bazillen gegenüber im Minimum $^1/_{25}$, im Maximum $^1/_{10}$; Mäusetyphus im engeren Sinne, nämlich Ms 2, gegenüber im Minimum $^1/_{20}$, im Maximum $^1/_{10}$ betrug (Tab. 4 C). Deswegen müssen Typhus-, Paratyphus B- und Mäusetyphusbazillen unseren Bazillen verwandtschaftlich noch ferner stehen als Paratyphus A- und Hogcholerabazillen.

Zum Schlusse wurden Absorptionsversuche ausgeführt. Zuerst wurden unsere Bakterien, P. A. 1- und Hogcholerasera, mit den entsprechenden Bakterien gegenseitig erschöpft. In diesen Seris wurden die beiden genannten Bakterien agglutiniert. Es ergab sich, daß heterologe Bakterien nur für sich gerichtete Agglutinine absorbierten. Falls die Sera von unseren Bakterien und Paratyphus A mit entsprechenden Stämmen gegenseitig absorbiert wurden, so verhielten sich unsere

Bazillen dem Paratyphus A gegenüber so, daß erstere letzteren gegenüber 2 Rezeptoren enthalten. Ferner wurden Sera von unseren Bazillen und Paratyphusbazillen auf gleiche Weise Sera von unseren Bazillen und Mäusetyphusbazillen mit entsprechenden Bakterien absorbiert. Es ergab sich, daß heterologe Agglutinine dabei absorbiert werden, dagegen homologe Agglutinine ganz unerschöpft bleiben (Tab. V). Aus allen

Tabelle V.

Name der Immunsera	P.A. 1					Hg.ch. 1		P.A. 2		P.B. 1		Ms. 2	
Name der Bakterien	Vor der Absorption	absorbiert mit				Vor der Absorpt.	abs. m. P.A. 1	Vor d. Absorpt.	abs.m. P.A. 1	Vor d. Absorpt.	abs m P.A. 1	Vor d. Absorpt.	abs.m. P.A. 1
		Hg. ch. 1	P.A. 2	P.B. 1	Ms. 2								
P.A. 1	10 000	5 000	10 000	10 000	10 000	50 000	100 —	5 000	100 —	20 000	100 —	2 000	100 —
Hg.ch. 1	10 000 ±	100 —	.	.	.	100 000	100 000	.	.	.	.	.	.
P.A. 2	5 000	.	100 —	.	.	.	.	10 000	100 —	.	.	.	.
P.B. 1	2 000	.	.	100 —	.	.	.	.	.	10 000	10 000	.	.
Ms. 2	1 000	.	.	.	100 —	.	.	.	.	.	.	10 000	10 000

diesen Versuchen wurde sicher nachgewiesen, daß unsere Bazillen weder zu den Hogcholera-, noch zu den Paratyphus A-Bazillen gehören, so daß man sie wohl als selbständige Bakterien ansehen kann, wie dies Schimojo auch behauptete. Doch scheint es nach obigem Resultat auch so zu sein, daß sie sich Paratyphus A-Bazillen gegenüber so verhalten, wie die H-Form der X-Proteus-Bazillen ihrer O-Form gegenüber steht. Wenn man aber diese beiden Bakterien verschiedenen anderen repräsentierenden Seren gegenüber betrachtet, so wird klar, wie sich beide Bakterien gegensätzlich zueinander verhalten. Erstere Bakterien zeigten nämlich zu verschiedenen Bakterien, Hogcholera-, Typhus-, Hühnertyphus-, Paratyphus A- und Mäusetyphusbazillen, sehr starke agglutinatorische Beziehung, dagegen letztere gar nicht. Infolgedessen muß man doch annehmen, daß unsere Bakterien selbständige Bakterien sind, welche einerseits Paratyphus A-Bazillen, anderseits Hogcholera-, Hühnertyphus-, Typhus-, Paratyphus B-, Mäusetyphus- und Gärtner-Bazillen sehr nahe verwandt sind. Hier muß bemerkt werden, daß Serum von Kranken, bei welchen diese Bakterien nachgewiesen waren, entweder Typhusbazillen allein, oder Typhus- und Paratyphus B-Bazillen manchmal ebenso stark wie die eigenen Bakterien agglutinieren kann. Bei der Immunisierung der Kaninchen mit unseren Bakterien konnten wir nicht selten so ähnlich wirkende Sera herstellen, wie oben beschrieben. Diese Bakterienart scheint in Japan nicht selten vorzukommen, weil in den letzten Jahren von uns 6 und von Shimojo schon 7 beobachtet wurden.

Literatur.

Neukirch, Berl. klin. Woch. 1917. S. 360. — Weil u. Saxl, Wien. klin. Woch. 1917. S. 519. — Weil, Ibid. 1917. S. 1061. — Mac Adam, Lancet. 1919. p. 189. — Hirschfeld, Lancet. 1919. p. 296. — Tenbroeck, Journ. of exp. Med. Vol. 32. 1920. p. 33. — Andrews u. Neave, Brit Journ. exper. Pathology. Vol. 2. 1921. p. 157. — Aoki, Ikegami, Shoji, Murakami u. Tazawa, Tohoku Journ. of exp. Med. Vol. 5. 1924. — Shimojo, Ei-Sei Gaku Zasshi. Vol. 17. 1922. p. 223. (Japanisch.) — Ders., 15. Komagome Byoin Hokoku. 1923. p. 65. (Japanisch.)

Nachdruck verboten.

Vitaminähnliche Substanzen in ihrer Wirkung auf das Wachstum der Influenzabazillen (Baz. Pfeiffer).

II. Mitteilung: Die Wachstumsbeeinflussung der Influenzabazillen durch fremde Bakterien und ihre Zusammenhänge mit der Biologie des Influenzabazillus.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. **Werner Kollath**, Assistenten am Institut.

Mit 2 Tafeln.

Seit Graßberger (19) 1897 das „Riesenwachstum", Neisser (36) 1903 das „Ammenwachstum" und Cantani (5) 1901 das Wachstum der IB (Bac. influenzae Pfeiffer) auf blutfreien Nährböden mit Zusatz abgetöteter Bakterien beschrieben haben, sind die hierdurch aufgeworfenen Fragen noch nicht restlos beantwortet. In Nachprüfungen konnten die Befunde der genannten Autoren nur teilweise bestätigt werden [Ghon und v. Preysz (18) u. a.]; es gibt aber wohl kaum einen Befund, der nicht mehrfach angezweifelt ist, so daß die Literatur ein ungemein buntes Bild bietet. Zusammenfassende Angaben über die bisherigen Arbeiten finden sich bei Knorr (26), auf den ich hier verweisen kann. Leichtentritt wies auf den möglichen Zusammenhang des Symbiosephänomens mit der Wirkung akzessorischer Nährstoffe hin. Knorr macht darauf aufmerksam, daß der Grund der verschiedenen Resultate vor allem in der verschiedenen Technik der Untersucher liegt, und gibt gleichzeitig eine Definition des „Ammenwachstums": es sei „charakteristisch für nicht optimale Nährböden". Er schreibt: „Zusammenfassend beruht somit die Wirkung der Ammenkeime auf dem Ersatz des im Nährmittel zerstörten bzw. verminderten Vitaminkörpers . . . ., während auf einem wirklich geeigneten Nährboden selbst die fördernde Wirkung fehlt, ja sogar in das Gegenteil umschlagen kann." Die näheren Bedingungen für die einzelnen Wachstumsfaktoren des IB zu erforschen, ist der Zweck der folgenden Arbeit.

Knorr bringt auch zuerst in die Fülle der Erscheinungen einige Ordnung, indem er genau nach den verschiedenen Nährmedien einteilt, ob blutfrei oder bluthaltig, ob lebende oder tote Keime als Ammen verwendet wurden. Doch habe ich im folgenden für meine Versuchsanordnung ein anderes Prinzip gewählt, das sich aufbaut auf unseren heutigen Kenntnissen von den Ernährungsbedürfnissen des IB, also nicht die Nährmedien in ihrer Gesamtheit, sondern nach ihrem Gehalt an einzelnen Wachstumsfaktoren berücksichtigt.

Zur Begründung gebe ich zunächst einen kurzen Ueberblick über die Biologie des IB nach unsern heutigen Kenntnissen: Die Einteilung von Thjötta und Avery (47), daß die IB einen X- und einen V-Faktor zum Wachstum brauchen, ist in der Literatur fast allgemein aufgenommen; unter V-Faktor versteht man die vitaminähnliche Sub-

stanz, die vorzugsweise in Blut, aber auch in Pflanzen, und sicher wohl auch beim Wachstum von Bakterien vorkommt. Vermutungen über das Wesen dieses V zu äußern, erscheint zurzeit noch nicht aussichtsvoll, weil wir bisher nur teilweise sein physikalisches Verhalten, aber noch nichts von seiner chemischen Struktur kennen. Aus denselben Gründen heraus kann man aber auch nicht mit Weichardt, Wyon, Ayers und Mugde den Vitamincharakter ablehnen und statt dessen bestimmte Aminosäuren und andere chemisch wohl charakterisierbare Substanzen für das Wachstum verantwortlich machen. Denn es ist in der Vitaminliteratur bereits mehrfach vorgekommen, daß sich bei Nachprüfungen im Tierversuch Vitaminverunreinigungen in anscheinend chemisch reinen Stoffen gefunden haben (Funk).

Auch über den X-Faktor ist noch keine Einigung erzielt. Von den meisten Autoren wird er, entsprechend der von Anfang an geäußerten Ansicht von Pfeiffer und auch den meisten späteren Autoren, für zusammenhängend mit dem **eisen**haltigen Blutfarbstoffbestandteil angesehen. Thjötta und Avery haben in ihren Arbeiten gefunden, daß er aber auch in Früchten (Kartoffeln, Bananen usw.) vorkommt. Diese Befunde sind bisher von allen Nachprüfern bestätigt worden. Das Gemeinsame scheint der Eisengehalt zu sein. Es ist der Verdacht ausgesprochen (Thjötta und Avery, Knorr, Gehlen, Tinti), daß dieser X-Faktor immer benzidinpositiv sei, und man hat daraus, wie aus seiner Wirksamkeit in höchsten Verdünnungen geschlossen, daß seine Wirkungsweise katalytisch sei. Da aber die Banane zwar Eisen enthält, aber nicht die katalytische Wirkung bei Anwesenheit von Benzidin zeigt, sie aber trotzdem intensiv wachstumsfördernd auf den IB wirkt, kann man wohl schon aus dieser Tatsache allein schließen, daß nicht lediglich die katalytische Wirkung des Eisens hier in Frage kommt, sondern daß daneben noch andere Stoffwechselvorgänge eine Rolle spielen. Pfeiffer hat daran gedacht, daß das Eisen im Leben des IB eine ähnliche Rolle spielt wie im Leben der sog. Eisenbakterien. Und es scheint möglich zu sein, daß in der Tat ähnliche Verhältnisse vorliegen (s. Versuch VIII).

Während in der Literatur mit einziger Ausnahme von Terada nur diese beiden Faktoren (X und V) als für den IB notwendig angeführt werden, habe ich in meiner früheren Arbeit (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93) zeigen können, daß der IB zum Wachstum noch einer dritten ernährenden Substanz bedarf, wenn auf festem Nährboden eine isolierte Koloniebildung stattfinden soll. Sie läßt sich z. Z. ebenfalls nicht genau charakterisieren, kann eventuell auch aus pflanzlichem Eiweiß bestehen, stammt aber besser aus dem Fleischwasser. Auch tote Bakterienleiber, selbst arteigene, können sie darstellen, und man betrachtet sie wohl am besten als ein Gemisch verschiedener Substanzen, das erst unter dem Einfluß von V und X zum Körperaufbau des IB verwendet werden kann.

So viel über die Ernährungsbedingungen. Der Wachstumsvorgang als solcher ist nun aber, abgesehen von den Nährstoffen, noch von äußeren Bedingungen abhängig, die im Nährboden außerdem erfüllt sein müssen: geeigneter Alkaleszenzgrad, Agarprozentgehalt, ferner Bruttemperatur, Salzgehalt und geeignetes Fleischwasser. Auch diesen Bedingungen muß bei diesen Stoffwechselversuchen genaueste Sorgfalt zugewendet werden, damit man in der Lage ist, jeden einzelnen Faktor isoliert für sich abzuändern, während alle anderen unverändert bleiben.

Meinerseits habe ich in den folgenden Versuchen von den oben genannten Bedingungen nur den Alkaleszenzgrad einem genaueren Studium unterworfen, da ich als Ammenbakterien sowohl Säure- wie Alkalibildner auf den gleichen Platten verwendete; es waren infolgedessen Wachstumsunterschiede zu erwarten, die durch die Veränderung des Alkaleszenzgrades herbeigeführt sein konnten. Um eine Steigerung der Säurebildung herbeizuführen, setzte ich einer gleichlaufenden Versuchsreihe Traubenzucker zu, der von den meisten von mir verwendeten Keimen unter Säurebildung vergoren wurde. Die Alkalibildung durch den Bac. faecalis alcaligenes habe ich durch einen weiteren Zusatz nicht zu steigern versucht, da ihm in dem Eiweißgehalt des Nährbodens genügend Material zur Alkalibildung zur Verfügung stand (Kruse [28], Seitz [43]).

Eine Modifikation traf ich ferner mit dem Fleischwasser, bzw. der zur Agarherstellung verwendeten Bouillon. Bereits in meinen früheren Versuchen habe ich feststellen können, daß der sonst übliche Peptonzusatz für das Wachstum der IB von einer verhältnismäßig geringen Bedeutung ist und nur zu einer schwachen Verstärkung gegenüber gewöhnlicher Fleischwasserbouillon führt. Um nun die von mir verwendeten Nährböden, die durch die Bedürfnisse des Influenzabazillus schon reichlich kompliziert ausfallen, möglichst einfach zu gestalten, habe ich von dem Peptonzusatz stets abgesehen und lediglich das Fleischwasser als dritte Ernährungssubstanz verwendet. Bei dem fertigen Nährboden überzeugte ich mich durch Veraschen des Agars, daß mit Rhodanammon kein Eisen in ihm nachgewiesen werden konnte. Im übrigen habe ich in allen Versuchen gleichlaufend die folgenden Bedingungen verwendet: 0,5 Proz. Kochsalzgehalt, Züchtungstemperatur von 37° und Agargehalt von 2 Proz.; von der Forderung, die in der Literatur mehrfach erhoben ist (Levinthal, Knorr u. a.), daß der Agarprozentgehalt am besten auf 1—$1^1/_2$ Proz. zu beschränken ist, habe ich Abstand genommen, da durch die Zusätze, die ich später erwähnen werde, der Agarprozentgehalt sowieso auf $1^1/_2$—$1^3/_4$ Proz. herabgesetzt wurde.

Der Uebersichtlichkeit halber wiederhole ich noch einmal die einzelnen Faktoren, die ich in dem nun zu schildernden Versuch isoliert geprüft habe; in rohem Blutagar wurde untersucht die Wirkung des X- und V-Körpers bei 10 Proz. Blutgehalt; in Kochblutagar (nach Levinthal) das Verhalten derselben Stoffe bei 5 Proz. Menschenblut in aufgekochtem Zustande; dasselbe Blut wurde in gleicher Weise untersucht in einer Verdünnung 1:200; in einer noch höheren Blutverdünnung (3 Oesen Blutkörperchenlösung auf 10 ccm Agar) wurde die Wirkung des X-Faktors allein gemessen; der V-Faktor wurde isoliert studiert durch Zusatz von 2 ccm Kartoffelwasser (s. dort); den von mir angegebenen Vitaminagar (X + V enthaltend) prüfte ich ebenfalls. Zu einer ferneren Versuchsreihe setzte ich eine Eisenverbindung, um zu untersuchen, ob unter dem Einfluß bestimmter Bakterien diese Eisenverbindung in die für den IB notwendige Form überführt werden konnte, worauf Vorversuche hindeuteten.

Herstellung der verschiedenen Nährböden.

Im Interesse der Uebersichtlichkeit kann ich ohne einige Wiederholungen nicht auskommen und verweise zu dem Folgenden außerdem

auf die Tabelle I, in der die Gruppeneinteilung der Nährböden zusammengefaßt ist.

Als Ausgangsmaterial dienten 4 halbe Liter peptonfreier Bouillon von verschiedener Alkaleszenz: pH 7,8 (Lackmus stark alkalisch), pH 7,4 (schwach alkalisch), pH 7,0 (neutral) und pH 6,8 (leicht sauer). Zu jedem halben Liter dieser 4 Bouillonarten gab ich nach der genauen Einstellung 0,2 ccm n-Sodalösung, um den durch das Kochen eintretenden Alkaleszenzverlust annähernd auszugleichen. Darauf erfolgte der Agarzusatz von 2 Proz.; der fertige Agar wurde dann in Röhrchen zu 10 ccm abgefüllt und in üblicher Weise sterilisiert. Durch diese Vierteilung konnte ich jeden später zu schildernden Versuch bei 4 verschiedenen Alkaleszenzgraden beobachten.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, wurden nun drei verschiedene Versuchsgruppen angesetzt. Die erste (Gruppe A) blieb zunächst ohne Zusatz, die zweite (Gruppe B) erhielt 1 Proz. Traubenzucker (je 1 ccm einer 10proz. sterilen Traubenzuckerlösung), zu der dritten (Gruppe C) wurde je 1 ccm einer Friedländer-Emulsion zugesetzt (24 Std. alte Kultur auf Agar, Kochsalzabschwemmung, 1 Std. bei 58° im Wasserbad sterilisiert). Dieser Zusatz diente dazu, 1) die Einwirkung von Bakterieneiweiß als dritte ernährende Substanz, 2) den etwaigen Einfluß der Kohlehydrate in der Friedländer-Kapsel auf die Säurebildung und 3) eine eventuell vorhandene vitaminähnliche Wirkung auf die IB zu studieren. Gleichzeitig wurde der Einfluß auf die Ammenkeime geprüft.

Tabelle I.
2 Proz. Agar ohne Pepton.

	Gruppe A ohne Zusatz				Gruppe B 1 Proz. Traubenzucker				Gruppe C Friedländer-Emulsion			
pH	7,8	7,4	7,0	6,8	7,8	7,4	7,0	6,8	7,8	7,4	7,0	6,8
I	ohne weiteren Zusatz				ohne weiteren Zusatz				ohne weiteren Zusatz			
II	5 Proz. Menschenblut, gekocht				5 Proz. Menschenblut, gekocht				5 Proz. Menschenblut, gekocht			
III	Menschenblut, gekocht, 1:200				Menschenblut, gekocht, 1:200				Menschenblut, gekocht, 1:200			
IV	3 Oesen Blutkörperchenlösung				3 Oesen Blutkörperchenlösung				3 Oesen Blutkörperchenlösung			
V	2 ccm Kartoffelwasser				2 ccm Kartoffelwasser				2 ccm Kartoffelwasser			
VI	sog. Vitaminagar				sog. Vitaminagar				sog. Vitaminagar			
VII	10 Proz. Kaninchenblut				10 Proz. Kaninchenblut				— *)			
VIII	Ferr. oxyd. ammoniat. 1:20000				Ferr. oxyd. ammoniat. 1:20000				Ferr. oxyd. ammoniat.**) 1:20000			

*) nicht angestellt, **) statt Friedländer-Emulsion 2 ccm Kartoffelwasser.

Innerhalb dieser Oberteilung der 3 Gruppen A, B und C erfolgten nun die Zusätze, die zur Untersuchung des Verhaltens der X- und V-Körper dienten; nur die 1. Reihe I blieb ohne weiteren Zusatz, da sie gleichzeitig als Kontrolle für den Agar diente, ob er allein oder in Zusatz mit den Ammenkeimen das Wachstum der IB ermöglichte.

Reihe II: erhält 5 Proz. Menschenblut, einmal 2 Min. im Agar aufgekocht.

Reihe III: erhält Menschenblut verdünnt mit Kochsalz (1:9, davon 0,5 ccm zu jedem Röhrchen), einmal 2 Min. aufgekocht. (Blutverdünnung im Agar also 1:200.)

Reihe IV: erhält 3 Oesen einer konzentrierten Lösung von roten Blutkörperchen in sterilem dest. Wasser, 1 Min. gekocht (Pferdeblutkörperchen 3mal in Kochsalzlösung gewaschen, dann mit dest. Wasser zum ursprünglichen Volumen aufgefüllt).

Reihe V: erhält 2 ccm Kartoffelwasser (sterile, frische Kartoffeln kleingeschnitten, in Erlenmeyer-Kolben mit dest. Wasser übergossen, 5 Min. im Wasserbad aufgekocht, dann 5 Tage stehen lassen (genauere Mitteilung s. vorhergehende Arbeit Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93).

Reihe VI: erhält 3 Oesen Blutkörperchenlösung (hergestellt wie IV) + 2 ccm Kartoffelwasser (hergestellt wie V). Nach Zusatz des Kartoffelwassers darf der Agar nicht mehr aufgekocht werden (sogenannter Vitaminagar).

Reihe VII: erhält 10 Proz. Kaninchenblut, in der Petri-Schale mit 50° warmem Agar gemischt (ungekocht!)

Reihe VIII: erhält 0,5 ccm einer Lösung 0,01 zu 10 Aqua dest. von Ferrum oxydatum ammoniatum, auf 10 ccm Agar, so daß die Endverdünnung im Agar 1:20000 beträgt. In Vorversuchen hatte ich festgestellt, daß diese Verdünnung keinen hemmenden Einfluß auf das Wachstum von IB in sonst optimalem Nährboden hatte. Das Präparat wählte ich deswegen, weil es sich kolloidal löst. Es muß unmittelbar vor Zusatz zum Agar in Wasser gelöst werden und innerhalb des Agars sterilisiert werden, da sonst eine Zersetzung des Präparats eintritt und die Resultate dadurch beeinflußt werden. Dieser Versuch (Reihe VIII) wurde noch insofern modifiziert, als zu ihm statt der Friedländer-Emulsion 2 ccm Kartoffelwasser zugesetzt wurden; es sollte dadurch in dieser Versuchsreihe probiert werden, ob eine sicher ausreichende Vitaminmenge, wie sie in dem Kartoffelwasser vorhanden ist, durch die Gemeinschaft mit dem Eisen allein wirksam sein kann.

Zu der Versuchsreihe Nr. VII wurde keine Friedländer-Emulsion zugesetzt. Der Grund dafür war, daß ich die sämtlichen Versuche nicht an einem Tage ansetzen konnte und den Versuch VII erst einige Tage später anstellte. Mir stand unter diesen Umständen nicht mehr die gleiche Friedländer-Aufschwemmung zur Verfügung, und die Resultate wären also nicht beweisend gewesen. Zur genauen Bewertung dieser ganzen Versuchsreihen ist es aber unbedingt notwendig, daß die sämtlichen Reihen möglichst an einem Tage und mit denselben Materialien angesetzt werden, da sonst im Blut Veränderungen entstehen, die einen verschiedenen Ausfall des Versuches herbeiführen.

Terada weist in seiner ausführlichen Arbeit auf diese speziellen Blutveränderungen hin und beweist, daß eine fermentähnliche Substanz im Serum des frischen Blutes eine destruktive Wirkung auf den Stoff hat, der das Wachstum der IB fördert. Er spricht nur von einem Stoff und berücksichtigt nicht die neueren Anschauungen, nach denen zwei Substanzen im Blut für das Wachstum der IB notwendig sind. Es ist mit Sicherheit anzunehmen, daß diejenige Substanz, die durch das Serumferment zerstört wird, die vitaminähnliche Komponente ist und nicht der Blutfarbstoff, denn, wie ich in meiner

früheren Arbeit gezeigt habe, kann man Blut, das durch diese Fermenttätigkeit unwirksam wurde, durch Zusatz von Kartoffelwasser wieder reaktivieren.

Bei meinen Versuchen habe ich diese Veränderungen im Blut ebenfalls finden können, und sie machten sich mehrfach bei Versuchswiederholungen mit dem gealterten Blut unangenehm bemerkbar. Auf ihnen beruht es, daß der ganze Versuch an einem Tage angestellt werden muß, da man nur dann mit gleichartigem Ausgangsmaterial arbeiten kann. Meine Befunde gelten somit auch zunächst nur für diesen einen speziellen Versuch. Da aber sämtliche Beobachtungen völlig gleichmäßig ausfielen, haben sie doch wohl allgemeinere Geltung und lassen sich für eine Beurteilung der Vorgänge beim Ammenwachstum generell verwerten.

Beimpfungstechnik.

Um die Influenzabazillen in einzeln liegenden Kolonien zu erhalten, verrieb ich eine Oese einer 24stündigen IB-Kultur von einer Levinthal-Platte (Abnahme der Kultur mit einer auf gewöhnlichem Agar abgekühlten Oese, um die Mitnahme von Nährbodenbestandteilen [Blut] möglichst auszuschalten) in 2 ccm Kochsalzlösung und verteilte von dieser leicht getrübten Emulsion eine Oese von der Mitte der Platte mit dem Drigalski-Glasspatel sorgfältig über jede Platte. Ich habe auf diese Weise in jedem Falle ein ganz gleichmäßig verstreutes Wachstum der IB-Kolonien auf den Platten erreichen können. Dann teilte ich mir jede Platte auf der Rückseite in 6 gleiche Sektoren und brachte an die Basis eines jeden Sektors etwa 1 cm von der Plattenwand entfernt, durch einen seichten Stich in den Agar eine Spur der zu prüfenden Ammenkeime. Dadurch erreichte ich, daß an diesen Stellen stets eine massive Koloniebildung des Ammenkeimes eintrat, und daß durch diese große Masse die chemischen Veränderungen im Nährboden erheblich deutlicher wurden, als wenn man mit einer einzelnen Kolonie arbeitet. Auch waren die einzelnen Ammenkeime voneinander weit genug entfernt, so daß sie sich in den meisten Fällen nicht gegenseitig in ihrer Wirkung störten. Außerdem blieb in der Mitte ein Feld frei, in dem die Wirkungen des Nährbodens auf den IB allein beurteilt werden konnten, da der Einfluß der Ammenkeime nicht so weit reichte (s. Abb. 1).

Wahl der Ammenkeime.

Von den in der Literatur als gute Ammen bekannten Keimen mußte eine für den Rahmen dieses Versuches geeignete Auswahl getroffen werden, und zwar kamen insgesamt 6 Arten in Frage, entsprechend der Sektorenzahl der Platten. Um die Wirkung der Alkali- bzw. der Säurebildung auf den Nährboden zu studieren, suchte ich als typischen Vertreter der Alkalibildung den Bac. faecalis alcaligenes (Faec. alc.), für die Säurebildung einen Coli aus unserer Sammlung heraus. Ferner nahm ich eine Bac. Friedländer-Kultur, die ich einerseits lebend in gleicher Art wie die andern Ammen auf die Platten impfte; andererseits stellte ich von derselben Kultur die Aufschwemmung her, die einer Plattenserie gleichmäßig zugesetzt wurde.

Tabelle II.

			Coli			Friedländer			Faec. alc.			V_1			V_3			Luftkokkus		
		PH	ohne	Trbz.	B. Fr.	ohne	Trbz.	B. Fr.	ohne	Trbz.	B. Fr.	ohne	Trbz.	B. Fr.	ohne	Trbz.	B. Fr.	ohne	Trbz.	B. Fr.
I	Agar	7,8																		
	2 Proz.	7,4																		
	ohne Pepton	7,0																		
		6,8																		
II	Agar, 2 Proz.	7,8																		
	ohne Pepton + 5 Proz.	7,4	‖	‖ —	‖ (+)	‖	‖—	‖	‖ —	‖	‖ (+)	‖	‖ (—)	‖	‖	‖ (—)	‖	‖	‖	‖
	Menschenblut, defi-	7,0	‖	‖ =	‖	‖	‖=	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖
	briniert, aufgekocht	6,8	‖	‖ ≡	‖ +	‖	‖≡	‖ +	‖	‖ +	‖ + +	‖ (—)	‖	‖ ∓	‖ (+)	‖ (+)	‖ ∓	‖	‖	‖
III	Agar, 2 Proz.	7,8			‖ +			‖ +												
	ohne Pepton + def.	7,4	‖ (+)	‖ +	‖ (+)	‖ (+)	‖ +	‖ (+)	‖	‖ +	‖	‖	‖ +	‖	‖ (+)	‖ +	‖	‖	‖ (+)	‖
	Blut 1:200, aufge-	7,0	‖ (+)	‖ =	‖	‖ (+)	‖=	‖	‖	‖ +	‖	‖ (—)	‖ +	‖	‖ (—)	‖ +	‖	‖	‖	‖
	kocht	6,8	‖ +	‖ ∓	‖	‖ +	‖ ∓	‖	‖ +	‖ + +	‖	‖ ∓	‖	‖ ∓	‖ ∓	‖	‖ (+)	‖	‖ (+)	‖
IV	Agar, 2 Proz.	7,8																		
	ohne Pepton + 3 Oesen	7,4	‖ +	‖ +		‖ + +	‖ +		‖ +	‖ (+)		‖ +	‖		‖ +	‖ +		‖ +	‖ (+)	
	Blutkörperchen-	7,0	‖ + + +	‖ +		‖ + + +	‖ +		‖ + +	‖ (+)		‖ + +	‖ +		‖ + +	‖ +		‖ + +	‖ (+)	
	lösung	6,8																		
V	Agar, 2 Proz.	7,8																		
	ohne Pepton 2 ccm	7,4																		
	Kartoffelwasser	7,0																		
		6,8																		
VI	Agar, 2 Proz.	7,8																		
	ohne Pepton + 3 Oesen	7,4	‖	‖		‖	‖		‖	‖		‖	‖		‖	‖		‖	‖	
	Blut + 2 ccm Kar-	7,0	‖	‖		‖	‖		‖	‖		‖	‖		‖	‖		‖	‖	
	toffelw. (Vitaminag.)	6,8																		
VII	Agar, 2 Proz.	7,8			*)			*)			*)			*)			*)			*)
	ohne Pepton + 10 Proz.	7,4	‖ +	‖ —		‖ +	‖		‖ +	‖		‖ +	‖ (+)		‖ (+)	‖ (+)		‖	‖	
	Kaninchenblut	7,0	‖	‖ =		‖	‖ +		‖ +	‖ +		‖ +	‖ +		‖	‖		‖	‖	
	(Blutagar)	6.8	‖ (+)	‖ ≡		‖ +	‖ +		‖ + +	‖ + +		‖ —	‖ +		‖	‖ (+)		‖	‖	
VIII	Agar. 2 Proz.	7,8			**)			**)		A	**)			**)			**)			A**)
	ohne Pepton + Ferr.	7,4								A	A							A	A	A
	oxyd. ammoniat.	7,0								A	A							A	A	A
	1:20 000	6,8		A					A		A									

Erklärung der Zeichen: ‖ = Wachstum der IB auf der Platte, A = Ammenwachstum der IB innerhalb der Zusatzkeime, + = Wachstumsförderung, — = Wachstumshemmung, ∓ = erst Hemmung, dann Förderung, ( ) = Erscheinung angedeutet. *) nicht angestellt, ** statt B. Fr.-Emulsion 2 ccm Kartoffelwasser.

Neben diesen 3 Keimen wählte ich 3 Luftkeime, die ich bei früheren Versuchen isoliert hatte. Zwei davon waren grampositive, sporenbildende und hämolysierende Stäbchen, von denen das eine auf Serumplatten intensiv peptonisierend wirkte, ähnlich dem Heubazillus. Sie vergoren Traubenzucker sehr stark und zeigten auf der Blutverdünnungsplatte, auf der ich sie fand, eine intensive Förderung des IB, die mir hauptsächlich in einer Vitaminproduktion zu liegen schien; der Kürze halber habe ich sie deswegen im folgenden als V-Keime bezeichnet und fortlaufend numeriert. Zu meinen Versuchen wählte ich aus meiner Sammlung V^1 und V^3. Als letzten Keim nahm ich einen grampositiven, gelbroten Farbstoff produzierenden Luftkokkus, der sich auf der Ausgangsplatte dem IB gegenüber als indifferent erwiesen hatte: er besaß nicht die Fähigkeit, Traubenzucker zu vergären, und sollte deshalb eine Art von Kontrolle darstellen. Zufällig zeigte sich aber, daß er unter bestimmten, nachher zu schildernden Bedingungen doch wachstumsfördernd auf den IB wirken konnte.

Herstellung des Versuchsprotokolls.

Von sämtlichen Platten wurden nach 8—24 Std. Bebrütungszeit genaue Zeichnungen angefertigt, die die Verteilung und Größe der Influenzakolonien und die Größe der Ammenkeime (Stichkolonien) wiedergaben. Etwaige Aenderungen nach 48stündiger Bebrütungszeit wurden neben den Zeichnungen schriftlich vermerkt. Auf diese Weise gewann ich ein Protokoll, das dauernd jeden Vergleich der Platten untereinander ermöglichte. Ein schriftliches Protokoll allein wäre bei der ganzen Art des Versuches unübersichtlich geworden. Leider muß ich mich in dieser Arbeit aber doch auf schriftliche Wiedergaben der Befunde beschränken, da eine Reproduktion der zahlreichen Zeichnungen aus wirtschaftlichen Gründen nicht möglich ist. Nur eine Abbildung einer besonders charakteristischen Platte füge ich ein (Abb. 1).

Versuchsergebnisse.

Tabelle 2. Gruppe A, B, C, Querreihe I.

IB sind nirgends gewachsen, auch nicht innerhalb der Ammenkolonien (Prüfung durch mikroskopische Untersuchung, event. Klatschpräparate).

Zusammenfassung:

Auf blut-, eisen- und vitaminfreiem Agar von stark alkalischer bis schwach sauerer Reaktion ist also kein IB-Wachstum zu erreichen, wenn die IB in der angegebenen Form geimpft werden. Sowohl Ammenkeime, wie Zusatz von Traubenzucker und Friedländeremulsion in der angegebenen Stärke sind auf dieser Agarart wirkungslos.

Tabelle 2, Gruppe A, B, C, Querreihe II (5proz. in Agar gekochtes Menschenblut).

pH 7,8: IB sind nirgends gewachsen, Ammenkeime gut gewachsen. Um Keim V_1, bei Friedländerzusatz auch um V_3 ist der Agar durchsichtig geworden (hämolyseähnliche Erscheinung); bei Friedländerzusatz am stärksten.

pH 7,4: Dichtes, gleichmäßiges IB-Wachstum. Um Fäk. alk. kleinere Kolonien, die als Ausdruck einer leichten Wachstumshemmung durch die noch stärkere Alkalisierung des Nährbodens aufzufassen sind. Die lytischen Erscheinungen um

V_1 deutlich. Bei Traubenzuckerzusatz sind die IB-Kolonien sämtlich kleiner, zeigen also Zeichen von Hemmung; diese Erscheinung ist konstant bei allen Versuchen. Eine geringe Vergrößerung findet sich nur in der Plattenrandzone, die dicker und damit feuchter ist. Um V_1, vor allem aber um Coli und Friedländer, sind keine IB gewachsen. Wie aus der nächsten Plattenserie hervorgeht, handelt es sich hier um den Einfluß der Säurebildung, die aber in der ziemlich alkalischen Platte noch wenig zur Geltung kommt.

Bei Friedländerzusatz sind die beiden V-Keime sehr üppig über die halbe Platte gewachsen, um Coli und Friedländerkolonie findet sich eine leichte Verstärkung des IB-Wachstums.

pH 7,0: Ueberall gleichmäßiges Wachstum der IB-Kolonien (so gut wie auf Levinthal-Agar). Auch im Bereich der Lyse um V_1 und V_3 keine Abschwächung. Wie aus den weiteren Versuchen hervorgeht, müssen hier die IB schneller gewachsen sein, als die Nährbodenzerstörung durch die V-Keime eintreten konnte. (Siehe Versuch II pH 6,8 bei Friedländerzusatz.)

Bei Traubenzuckerzusatz findet sich wieder eine Abschwächung des IB-Wachstums. Um Coli und Friedländer befindet sich eine ausgedehnte, von IB freie Zone, jenseits deren erst kleinste Kolonien wachsen, die allmählich größer werden, bis sie die Durchschnittsgröße auf der Platte erreichen.

Bei Friedländerzusatz starkes Wachstum der V-Keime, keine Größenveränderungen und Hemmungszonen bei den IB-Kolonien.

pH 6,8: IB-Kolonien nur staubförmig groß; um die V-Kolonien Lyse des Agars, bei V_1 mit ein wenig kleineren, bei V_3 mit etwas größeren Kolonien. Von seiten der übrigen Keime keine Beeinflussung der IB.

Bei Traubenzuckerzusatz sind die IB fast noch kleiner; um Coli und Friedländer ist die IB-freie Zone noch ausgedehnter als bei pH 7,0; um Fäk. alk. ist dagegen eine deutliche Wachstumsverstärkung bemerkbar (Korrektur des leicht sauren Nährbodens durch die Alkalibildung).

Bei Zusatz von Friedländeremulsion findet sich die in der Fig. 1 wiedergegebene Wachstumsverteilung (diese Abbildung ist gleichzeitig ein Muster der angewendeten Impftechnik); zunächst imponiert die vollkommen freie Zone um V_1 und V_3, jenseits deren eine deutliche Wachstumsverstärkung der IB-Kolonien auffällt. Während bei Traubenzuckerzusatz (infolge der Säuregärung) um Coli und Friedländer die ausgedehnte Hemmungszone bestand, zeigt sich hier eine kräftige Verstärkung des IB-Wachstums; bei weitem am kräftigsten ist diese Wachstumsverstärkung um den Fäk. alk., teilweise infolge der Alkaliproduktion, teilweise wegen der Produktion eines anderen wachstumsfördernden Stoffes, der auch von den anderen Ammenkeimen, mit Ausnahme des Luftcoccus, anscheinend in gleicher Weise produziert wird und in die Umgebung diffundiert.

Es mag hier gestattet sein, daß ich an Hand dieses Befundes den Wachstumsmechanismus schildere, wie man ihn sich vorstellen kannn; ich kann mich dann bei der Schilderung der späteren Versuche etwas kürzer fassen. Zunächst zeigt sich die bekannte Tatsache, daß die IB-Kolonien auf diesem, dem Blutgehalt nach optimalen Nährboden bei ungünstiger pH wesentlich schwächer wachsen, und daß trotz der ungünstigen pH die Ammen sowohl die Säure- wie die Alkalibildner, in der Lage sind, das Wachstum zu verstärken. Denkt man nun daran, daß der X-Faktor und die dritte ernährende Substanz in diesem Nährboden reichlich vorhanden sind, daß also nur die V-Substanz fehlt, dann bleibt nichts anderes übrig, als anzunehmen, daß der IB für sich allein bei ungünstiger pH das im Agar gelöste Blut-V nur in geringem Maße zu verwerten vermag, während er hingegen das frisch produzierte Bakterien-V weit besser für seinen Körperaufbau zu verwerten imstande ist. Denn, wenn unsere Ansichten über die wachstumsfördernde Wirkung der V- und X-Substanz richtig sind, kann auf diesem Nährboden nur eine Veränderung des V in Frage kommen; und wir müssen aus diesem Befunde schließen, daß für den IB Blut-V und Bakterien-V sich gegenseitig vertreten können. Ich befinde mich

damit im Einklang mit den meisten anderen Autoren (Knorr, Tinti u. a.).

Der Befund auf dieser Platte läßt aber auch den Schluß zu, daß nicht nur ein Ersatz des Blut-V durch Bakterien-V vor sich geht, sondern daß von Seiten der einzelnen Ammenkeime evtl. auch andere für den IB notwendige Stoffe verändert werden können. Bei dem Faek. alk. ist es z. B. die durch seine Alkaliproduktion gebesserte Reaktion des leicht sauren Nährbodens, die neben der V-Produktion die Wachstumsmöglichkeiten für den IB soweit bessert, daß um den Fäk. das stärkste Wachstum der IB stattfindet. Ebenso kann es auch ungünstige Alkaleszenzveränderungen geben, z. B. durch überschüssige Säurebildung durch Coli oder Friedländer. Um die beiden V-Keime jedoch sind die Hemmungszonen wohl anders zu erklären. Während trotz der Lyse auf den Platten ohne Friedländer-Zusatz noch ein IB-Wachstum in unmittelbarer Nähe der V-Keime stattgefunden hat, weil die Nährbodenverhältnisse noch günstig waren, bevor die V-Keime ihre zerstörende Wirkung auf den Nährboden entfalten konnten, macht sich hier ein wachstumsfördernder Einfluß des Friedländer-Zusatzes auf die V-Keime selbst dadurch geltend, daß eine Zerstörung des Nährbodens in der unmittelbaren Umgebung der V-Keime stattfindet, bevor eine IB-Koloniebildung eintreten konnte. Gleichzeitig wird aber von diesen V-Keimen Bakterien-V produziert, das über die gehemmte Zone hinaus diffundiert und dort eine Wachstumsverstärkung hervorruft. Da dieses produzierte V also unbeschadet die gehemmte Zone passiert, X-Substanz aber auch reichlich vorhanden ist, eine Säurebildung außerdem nicht eintritt (vgl. das Verhalten von Coli und Friedländer), so kann die Erklärung für diese eigentümliche Doppelwirkung nur darin liegen, daß durch fermentative Tätigkeit eine Zerstörung der dritten ernährenden Substanz eingetreten ist. Diese Zerstörung ist nun bei dem, die V-Keime fördernden Friedländer-Zusatz wohl schneller erfolgt, als der IB wachsen konnte. Aus der Tatsache, daß der eine V-Keim peptonisierende Fähigkeit besitzt, glaube ich schließen zu dürfen, daß es sich um eine den Verdauungsfermenten ähnliche Wirkung handelt, die diese dritte Substanz sowohl im Blut wie im Fleischwasser abbauen und für den IB ungeeignet machen läßt, vielleicht unter gleichzeitiger Bildung hemmender Abbauprodukte. Terada hat nachgewiesen, daß verdautes Blut noch den V-Faktor enthält, und daß man mit einem derartigen Blutkörperchenbreipepton einen Agarnährboden, der unverdautes Fleischwasser enthält, für IB geeignet machen kann. Nach Teradas Versuchen gibt es auch eine Widerstandsfähigkeit des Blut-V gegen andere Fermente (Papayotin und Pankreatin). Aus dem Befund auf dieser Platte muß man schließen, daß auch das Bakterien-V gegenüber Verdauungsfermenten in hohem Maße resistent sein kann, wenigstens solange es sich um die Wirkung und Tätigkeit lebender Keime handelt. Es unterliegt wenigstens anscheinend nicht dem Einfluß eiweißspaltender Fermente, woraus sich wieder Schlüsse auf seine Konstitution ergeben können. Diese Wachstumsform eines „keimfreien Hofes“ und einer „Randwulstzone“ entspricht völlig den Beschreibungen von Löhner und Saxl über die oligodynamischen Wirkungen von Metallen, worauf ich in diesem Zusammenhang nur hinweisen will. Vergleichende Blutuntersuchungen habe ich noch nicht angestellt.

Zusammenfassung.

Der angewendete Kochblutagar, ähnlich dem Levinthalagar, ist optimal bei einer pH von 7,4—7,0, da eine weitere Verbesserung des Nährbodens durch die Ammenkeime nicht stattfindet (Knorr).

Dagegen zeigt sich, daß bestimmte Zusätze, wie Traubenzucker und Friedländeremulsion gleichwohl im Stande sind, auch auf diesem optimalen Nährboden ein Riesenwachstum zu erzeugen, anscheinend ein Beweis dafür, daß durch den Zusatz die Bedingungen für das IB-Wachstum verschlechtert und umgekehrt für die Ammenkeime verbessert sind. Mit dem gesteigerten Wachstum dieser Ammenkeime geht nun eine Produktion vitaminähnlicher Substanzen einher, die in den Agar diffundieren und das Riesenwachstum veranlassen.

Zusätze wie Friedländer-Emulsion und Traubenzuckerlösung können also auf die verschiedenen Bakterien in ungleichem Sinne wirken.

Tabelle 2, Gruppe A, B, C, Querreihe **III** (Menschenblut gekocht 1:200).

pH 7,8: IB sind nirgends gewachsen, die Ammenkeime sehr gut, die V-Keime bei Friedländerzusatz üppiger als bei konzentriertem Blutgehalt.

pH 7,4: IB-Kolonien sehr klein (Wirkung der Blutverdünnung); geringe Wachstumsverstärkung um Coli, Friedländer und V_3. Diese Verstärkung ist als Folge der V-Produktion der Ammenkeime anzusehen, auf der ziemlich stark alkalischen Platte aber noch ziemlich wirkungslos.

Bei Traubenzuckerzusatz sind die IB-Kolonien fast noch kleiner als ohne ihn. Die Ammenkeime sind gut gewachsen, ihre wachstumsfördernde Wirkung ist kräftiger. Der Grund dafür liegt 1) in der stattfindenden Säureproduktion (Veränderung der pH des Nährbodens nach pH 7,2 hin, dem Optimum für den IB), 2) in der dadurch fortfallenden schädigenden Wirkung des Traubenzuckerzusatzes auf den IB infolge der Zerlegung des Zuckers, und 3) in der Wachstumsförderung der Ammenkeime selbst und ihrer dadurch gesteigerten V-Produktion. Auf dieser Platte findet sich auch eine leichte Verstärkung um den Luftcoccus, ein Ausdruck dafür, daß er quantitativ scheinbar nur so geringe Mengen vitaminähnliche Substanzen zu produzieren vermag, daß er nur auf ausgesprochenen Hungernährböden im Notfall als Amme eintritt; die Wachstumsverstärkung kann hier auf keinen Fall aus der Alkaleszenzveränderung des Nährbodens beruhen, da der Luftcoccus Traubenzucker nicht vergärt.

Bei Friedländerzusatz sind die V-Keime wieder stark gewuchert, so daß sie fast die ganze Platte bedecken. Nur um den Coli und Friedländer sind einzelne IB-Kolonien gewachsen.

pH 7,0: IB überall gut gewachsen. Um die beiden V-Keime geringe Hemmung, um Coli und Friedländer schwache Verstärkung des Wachstums.

Bei Zusatz von Traubenzucker findet insgesamt wieder eine Wachstumsabschwächung des IB statt. Um Coli und Friedländer findet sich (entsprechend der Säurebildung) eine gehemmte Zone, jenseits deren eine geringe Wachstumsverstärkung stattfindet, es findet sich also ein ähnliches Bild wie bei den V-Keimen und hohem Blutgehalt. Die V-Keime zeigen dagegen auf dieser Blutverdünnungsplatte sofort eine Wachstumsverstärkung, ebenso wie bei Fäk. alk. Der Fortfall der Hemmung um die V-Keime entspricht hier einer fehlenden Hämolyse bei Traubenzuckerzusatz. Vielleicht aber auch liegt der Grund darin, daß bei der hohen Blutverdünnung zu wenig Gelegenheit war, hemmende Stoffe (aus der dritten ernährenden Substanz) zu entwickeln.

pH 6,8: Bei verschiedenen Versuchen wurden hier verschiedene Resultate erreicht, je nachdem, ob frisches oder altes Blut verwendet wurde. Wachstumsförderung fand sich gleichmäßig um Fäk. alk., Friedländer und Coli. Der Unterschied betraf nur die V-Keime, bei denen das erste Mal überhaupt keine Wachstumsbeeinflussung, bei späteren Wiederholungen erst eine Hemmungszone und dann erst eine Wachstumsförderung stattfand. Die Erklärung für die Verschiedenheiten scheint mir in der Blutveränderung durch den längeren Aufenthalt im Eisschrank zu liegen.

Bei Traubenzuckerzusatz sind die IB-Kolonien sehr klein auf der ganzen Platte; Wachstumsverstärkung findet sich um Fäk. alk. sofort, um Coli und Friedländer erst jenseits einer Hemmungszone. Bereits bei der Erscheinung der Platte vorher wies ich auf das verschiedene Verhalten der V-Keime beim ersten und zweiten Versuch hin; auch hier ließ sich das gleiche feststellen, und dieser doppelte Befund auf zwei Platten weist meines Erachtens auch darauf hin, daß es sich um eine Blutveränderung handelt, die vor dem Zusatz zum Nährboden eingetreten ist, und daß eine Verschiedenheit der Wirkung der V-Keime als solcher nicht in Frage kommt.

Zusammenfassung.

Auf einem Nährboden, der Menschenblut in einer Verdünnung von 1:200 in aufgekochtem Zustande enthält, tritt die Wachstumsverstärkung fast auf allen Platten deutlich ein. Hemmende Wirkungen fallen meist fort, wenn nicht durch Zusatz von Traubenzuckerlösung Gelegenheit zu reichlicher Säurebildung gegeben ist (bei pH 7,0 und 6,8) und bei Verschlechterung des Nährbodens durch Hämopepsie.

Das veränderte Verhalten gegenüber den 5proz. Blutplatten ist darauf zurückzuführen, daß infolge der Blutverdünnung auch die V-Substanzen in ihm verdünnt sind, und daß nun das Bakterien-V eintreten muß.

Tabelle 2, Gruppe A, B, C, Querreihe **IV** (3 Oesen Blutkörperchenextrakt).

pH 7,8: IB sind nirgends gewachsen; die Ammenkeime dagegen durchweg üppig, besonders die V-Keime. Bei Friedländeremulsionszusatz überwuchern die V-Keime in wenigen Stunden die ganzen Platten bei allen Alkaleszenzgraden. Es ist im Gegensatz zu den Platten mit konzentrierteren Blutlösungen deshalb mit Sicherheit anzunehmen, daß Blutplatten für die hier verwendeten Zusatzammenkeime auch hemmende Wirkungen haben können.

pH 7,4: Ohne weiteren Zusatz wächst der IB in Kolonien, die nur mikroskopisch erkannt werden können. Um die sämtlichen Ammenkeime findet sich eine ausgesprochene Wachstumsverstärkung, so daß Kolonien bis zu 1 mm Durchmesser entstehen. Bei Traubenzuckerzusatz sind die Kolonien des IB durchweg kleiner, auch die Ammenkolonien. Keine Hemmungszonen infolge Säurebildung.

pH 7,0: Die Ammenkolonien des IB (Abh. II um Baz. Friedländer) sind hier bei weitem am größten von allen Platten (über 2 mm). Bei Zusatz von Traubenzucker wieder etwas kleiner.

pH 6,8: Nirgends IB-Wachstum bei gutem Wachstum der Ammenkeime.

Zusammenfassung.

Bei dieser hochgradigen Blutverdünnung findet sich also nur noch Wachstumsförderung, wenn nicht besondere hemmende Faktoren eintreten. Interessant ist, daß bei starker Blutverdünnung die Hemmungszonen zurücktreten, was darauf schließen läßt, daß die hemmenden Stoffe aus dem Blut und nicht aus dem Fleischwasser gebildet werden (s. Hemmung um die V-Keime, Querreihe II). Auch ist die Säurebildung von wesentlich geringerem Einfluß und dies entspricht den bisherigen Beobachtungen (Grassberger), daß beim Ammenwachstum eine auffallende Gleichgültigkeit des sonst so empfindlichen IB gegenüber Alkaleszenzunterschieden eintritt.

Tabelle 2, Gruppe A, B, C, Querreihe **V** (2 ccm Kartoffelwasser).

pH 7,8 bis 6,8: IB sind nirgends gewachsen.

Zusammenfassung.

Das Kartoffelwasser allein ist also nicht im Stande, Wachstum der IB zu geben, auch nicht in Form des Ammenwachstums. Es fehlt an der X-Substanz, und die Ammenkeime sind nicht in der Lage, aus dem Blutfarbstoff diejenige Eisenverbindung herzustellen, die für das Wachstum der IB notwendig ist (s. dazu Querreihe VIII).

Tabelle 2, Gruppe A, B, C, Querreihe **VI** (sogenannter Vitaminagar).

pH 7,8: IB sind nirgends gewachsen. Ueppiges Wachstum der V-Keime, besonders bei Traubenzucker- und Friedländerzusatz.

pH 7,4: Ueppiges Wachstum der IB über der ganzen Platte, keine Wachstumsverstärkungen durch die Ammen. Durch Traubenzucker keine Abschwächung.

pH 7,0: Derselbe Befund, IB-Kolonien noch größer.

pH 6,8: Kein Wachstum der IB mehr.

Zusammenfassung.

Der Vitaminagar in der angegebenen Herstellung ist also bei pH 7,0 bis 7,4 absolut optimal für den IB. Interessant ist, daß selbst Traubenzuckerzusatz keine Hemmung für den IB mehr bewirkt, was vielleicht darauf schließen läßt, daß durch den Traubenzuckerzusatz irgend eine Veränderung im Blut eintreten muß, die wachstumshindernd für den IB wirkt. Ob eine Uebereinstimmung mit dieser Erscheinung und der oben geschilderten Beobachtung besteht, daß bei Traubenzuckerzusatz in meinen Versuchen die Hämolyse fortfiel, müssen weitere Versuche ergeben. Vorläufig fehlt jede Erklärung dafür. Charakteristisch ist wieder die erhebliche Wachstumsverstärkung der V-Keime, die dem Friedländer-Zusatz entspricht.

Tabelle 2, Gruppe A, B, C, Querreihe **VII** (10 Proz. Kaninchenblutagar, roh).

pH 7,8: Kein Wachstum der IB.

pH 7,4: Ueber der ganzen Platte bilden die IB ziemlich große Kolonien, die nach den ersten 24 Std. um sämtliche Keime mit Ausnahme des Luftcoccus deutlich vergrößert sind. Nach 48 Std. sind die IB-Kolonien auf der ganzen Platte gleichgroß; das bedeutet, sie sind durch die Ammen nur beschleunigt gewesen und auf den von Ammen einflußfreien Teilen spontan innerhalb von 48 Std. nachgewachsen. Auf diesem Blutagar ist also die 24stünd. Wirkung der Ammen von gleichem Effekt, wie der 48stünd. Aufenthalt im Brutschrank bei 37°. Um den Coli zeigt sich am ersten Tage eine geringe Aufhellung des Nährbodens, einhergehend mit bräunlicher Verfärbung, ebenso um die V-Keime.

Bei Traubenzuckerzusatz wird das Wachstum der IB wesentlich schlechter (s. Besprechung zu Querreihe V). Nur um die beiden V-Keime zeigt sich eine geringe Vergrößerung der Kolonien, während um den Coli eine leichte Hemmungszone vorhanden ist. Coli und Friedländer unterscheiden sich also dadurch in ihrer Wirkung als Ammen, daß Friedländer unter den Bedingungen dieses Versuches keine Hemmung bewirkt, im Gegensatz zu dem Verhalten auf Kochblut. Die fehlende Wachstumsverstärkung um die übrigen Ammenkeime entspricht sonst dem Verhalten auf Kochblutagar + Traubenzucker.

pH 7,0: Die Kolonien des IB sind durchweg wesentlich kleiner, eine Wachstumsverstärkung findet sich nur um Fäk. alk. und V_1; Hämolyse findet statt um Coli, V_1 und V_3. Hemmungszonen, wie bei Kochblutagar, fehlen also hier vollständig.

Bei Traubenzuckerzusatz findet sich wieder eine Hemmung um den Coli und eine geringe Förderung um Friedländer, Fäk. alk. und V_1.

pH 6,8: Staubförmiges Wachstum der IB über der ganzen Platte, geringe Verstärkung um Coli, bessere um Friedländer und Fäk. alk.; Hemmung des IB

um V_1 (also ein gegensätzlicher Befund zu pH 7,0); Hämolyse findet wieder statt um Coli, V_1 und V_3.

Bei Traubenzuckerzusatz erfolgt wieder eine ausgedehnte Hemmung um den Coli, geringe, aber deutliche Wachstumsförderung um Friedländer, Fäk. alk., V_1 und V_3.

Nach 48 Std. sind auch hier die Größenunterschiede der IB auf allen Platten ausgeglichen, nur die Hemmung um den Coli bleibt bestehen.

Läßt man die 48 Std. lang bebrüteten Platten einige Tage bei Zimmertemperatur stehen, dann kann man einen eigentümlichen Farbumschlag beobachten, der einen Rückschluß erlaubt auf die im Nährboden stattfindenden Verhältnisse. Im Bereich der hämolytischen Keime (V_1, V_3 und Coli) färbt sich der hellrote Blutagar dunkelbraunrot, während er um den Fäk. alk. und den Friedländer hellrot bleibt. Ebenso bleibt er auch auf der ganzen stark alkalischen Platte hellrot, während mit Zunahme der Säurereaktion der Farbumschlag immer deutlicher wird. Nun findet sich aber um alle 5 Keime in gleicher Weise auf der Blutplatte ohne Traubenzuckerzusatz eine Wachstumsbeschleunigung, d. h. sowohl hämolysierende, wie nicht hämolysierende, Blutfarbstoff verfärbende wie nicht verfärbende Keime und Säure- wie Alkalibildner wirken in gleicher Weise wachstumsbeschleunigend auf einer gewöhnlichen Blutplatte, wenn nicht durch Traubenzuckerzusatz besondere Bedingungen für Säurebildung (Coli!) geschaffen werden. Es besteht somit schlechterdings keine Gemeinschaft zwischen den einzelnen vom Nährboden gebotenen Faktoren, auf die sich die Wachstumsbeschleunigung durch die Bakterienwirkung zurückführen ließe. Man muß deshalb annehmen, daß die Wachstumsbeschleunigung auf einer anderen, den Bakterien gemeinschaftlichen Lebenstätigkeit der Ammen beruht; welcher Art diese ist, läßt sich wieder aus unserer Kenntnis der Wachstumsfaktoren für den IB folgern: da X- und 3. ernährende Substanz ausreichend vorhanden sind, kann nur die V-Produktion der Ammen in den ersten 24 Stunden die Ursache für die Wachstumsbeschleunigung sein. Das weitere Wachstum, das bekanntlich innerhalb von 48 Stunden auf dem Nährboden den Ammenkolonien angeglichen wird, ist dann eine Folge der bei 37° eintretenden Blutveränderung (Diffusion aus den roten Blutkörperchen).

Anfangs habe ich geglaubt, daß die Ammenwirkung auf frischem Blut auf hämopeptische Fermente mit einer Zersetzung der dritten ernährenden Substanz vor Entstehung hemmender Produkte, oder vielleicht auch auf eine Zerstörung des fermentähnlichen Serumbestandteils, der das Wachstum der IB hemmt, zurückzuführen sein könnte, aber nach wiederholten Versuchen scheint doch die Wirkung der Ammen auf rohem Blutagar genau die gleiche zu sein, wie auf hochgradig verdünnten Blutplatten, d. h. nur in der V-Produktion der Ammen zu beruhen, denn ein Einfluß auf die anderen Faktoren kann ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung.

Die Befunde auf 10proz. Blutagar lassen darauf schließen, daß die Wirkung der Ammenkeime zunächst unabhängig von dem Blutzusatz eintritt und nur so lange dauert, bis durch den Aufenthalt des Blutes im Brut-

schrank eine so weitgehende Diffusion der Blutbestandteile eingetreten ist, daß diese ihrerseits das Wachstum der IB bis zu der den IB möglichen Koloniengröße vorwärts bringen. Auf dieser erst langsam eintretenden Diffusion der Blutbestandteile beruht die Erscheinung des „Nachwachstums" der IB-Kolonien.

Tabelle 2, Gruppe A, B, C, Versuche **VIII** (Eisenhaltiger Agar).

Da die Ammenkeime auf dem von mir verwendeten Agar kein Wachstum der IB weder außerhalb noch innerhalb ihrer eigenen Kolonien zu erzeugen vermochten (s. Querreihe I), andererseits aber in der Literatur zweifellos beobachtete Fälle beschrieben sind (Neisser, Cantani, Luerssen), in denen es gelungen ist, auf in gewöhnlicher Weise hergestelltem Agar Wachstum von IB zu erzeugen, habe ich versucht, durch Zusatz einer stickstoffhaltigen, anorganischen Eisenverbindung, die sich kolloidal löst, den Bakterien Gelegenheit zu geben, aus dieser Eisenverbindung diejenige Substanz zusammenzusetzen, die für das Wachstum des IB brauchbar ist. Die stickstoffhaltige Verbindung wählte ich deshalb, weil von ihr aus am leichtesten die Beziehungen zu einer organischen Bindung als möglich erschien, und weil es Ghon und v. Preyß bei Zusatz von Cyaneisen gelungen war, auf Blutplatten, die an sich nur ein schwaches Wachstum der IB ergaben, durch Ammenkeime eine Verstärkung des Wachstums durch diese letzteren zu erreichen, so daß dem Eisen dabei eine Rolle zuzufallen schien. Die Agarzubereitung habe ich weiter oben erwähnt. Eines besonderen Hinweises bedarf es aber noch, daß die Verteilung des Eisens im Agar mit größter Sorgfalt vorgenommen werden muß, da sonst Differenzen auftreten. Ich habe auch oben erwähnt, daß ich diesen Versuchsreihen statt der Friedländeremulsion, die mir doch nicht mehr in gleicher Weise zur Verfügung stand, 2 ccm Kartoffelwasser als V-haltig zusetzte. Der Versuch hatte folgendes überraschende Ergebnis:

pH 7,8: Bei Agar + Eisen ohne weiteren Zusatz kein IB-Wachstum; dagegen wuchsen bei Zufügung von Kartoffelwasser innerhalb der Luftcoccus-, bei Traubenzucker innerhalb der Fäk. alk.-Kolonie große Mengen von IB, die sich bei Lupenvergrößerung auf der Platte deutlich unterscheiden ließen und durch Klatschpräparate (Fig. 3) und Abimpfungen unter dem Mikroskop identifiziert wurden.

pH 7,4: Innerhalb des Luftcoccus sind sowohl bei Traubenzucker- wie Kartoffelwasserzusatz IB gewachsen. Bei denselben Zusätzen fand sich auch Wachstum innerhalb des Fäk. alk. Die Fig. 4 zeigt die Mischkolonie. Die Identifizierung der IB erfolgte durch Abimpfen unter dem Mikroskop; sie befinden sich teilweise am Rande als Ringe, teilweise als helle Kolonien innerhalb der Kokkenkolonien. Außerdem können auch in unmittelbarer Umgebung der Mischkultur einzelne winzige IB-Kolonien isoliert wachsen, wie sich bei Versuchswiederholungen ergab.

pH 7,0: Genau der gleiche Befund wie bei pH 7,4.

pH 6,8: Die IB wachsen innerhalb der Fäk. alk.-Kolonie bei Zusatz von Kartoffelwasser und ohne diesen Zusatz, innerhalb des Coli aber nur bei Zusatz von Traubenzucker.

Zusammenfassung.

In einem Nährboden, der kolloidal gelöstes Eisen enthält, das an sich bei Gegenwart von V nicht zum Wachstum des IB ausreicht, kann das Eisen durch bakterielle Tätigkeit in einen Zustand überführt werden, der der Zusammensetzung des X entspricht. Diese Substanz bleibt aber fast ausschließlich innerhalb der Ammenkolonie, diffundiert nur sehr wenig in die Umgebung und führt, wenn das Bakterium gleichzeitig in geringen Mengen V produziert, zu der von Neisser beschriebenen Form des Ammenwachstums, das fast ausschließlich intrakolonial stattfindet.

Dieses überraschende Versuchsergebnis ist nun abhängig von der guten Verteilung des Eisens im Agar und vor allem wohl von der

kolloidalen Lösbarkeit. Denn wenn man die Eisenlösung im Wasser zu lange erhitzt, dann flockt sie braun aus und ist nicht mehr wirksam. Von diesem Befunde aus lassen sich nun auch sowohl die Befunde von Neisser wie Cantani, ebenso wie die Mißerfolge der meisten Nachprüfer erklären. Es ist nämlich sehr wohl denkbar, daß der Agar bei seiner Herstellung mit irgendwelchen Eisenverbindungen verunreinigt werden kann, und daß infolge dieser Verunreinigung besondere Keime das Ammenwachstum ermöglichten. Und, weil der Agar nicht verunreinigt war, gelang es den Nachprüfern nicht, dieselbe Erscheinung hervorzurufen. Daß es Bakterien gibt, die ein besonders nahes Verhältnis zum Eisen haben, geht aus der Mitteilung Luerssens hervor, der innerhalb des Prodigiosus (nach Veraschen) Eisen nachweisen konnte. In einer weiteren Veröffentlichung werde ich auf diese Verhältnisse näher eingehen.

Erwähnt werden mag, daß streng genommen nur diese Form der Mischkultur den Namen „Ammenwachstum" zu Recht trägt. Für die andern bedient man sich besser des Grassbergerschen Ausdrucks: „Riesenwachstum". Beide Erscheinungen sind durch ihre Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren charakterisiert: das Riesenwachstum durch die V-Produktion, das Ammenwachstum vor allem durch die X-Herstellung durch die Ammenkeime.

Beeinflussung der Ammenkeime selbst durch die Nährbodenzusätze.

Um das Protokoll nicht zu unübersichtlich zu gestalten, habe ich den Einfluß des Traubenzuckers und der Friedländer-Emulsion auf die Ammenbakterien selbst nicht mit aufgenommen, sondern gebe ihn hier in einem zusammenfassenden Ueberblick. Zunächst ist dabei festzustellen, daß der IB durch keinen der beiden Zusätze auf Agar allein zum Wachstum zu bringen war. Dieser Befund steht im Gegensatz zu vielen Literaturangaben (feste Nährböden mit Bakterienaufschwemmung beschreiben Cantani, Ghon und V. Preyss, Wolf, Auerbach, flüssige Nährböden Thjötta, Avery und Tinti). Von allen diesen Autoren wird angegeben, daß der Zusatz von Bakterienemulsion wachstumsfördernd sei; doch sind die angewendeten Methoden sehr verschieden, und deshalb lassen sich Vergleiche nicht ohne weiteres ziehen, auch kann man gegen die Folgerungen einige Bedenken nicht unterdrücken. Was zunächst die flüssigen Nährböden anbelangt, so habe ich in meiner ersten Arbeit (Centralbl. f. Bakter. Bd. 93) darauf hingewiesen, daß durch das gleichzeitige Ueberimpfen auch nur einer Oese IB-Kultur zahlreiche tote Bakterien mitüberimpft werden. Diese werden in dem flüssigen Nährboden ausgelaugt und ihre Leibessubstanz dient den noch lebenden Bakterien als Quelle für V- und X-Substanz, vielleicht auch für den 3. Faktor. Das findet ein Analogon im Verhalten der Hefe im synthetischen Nährboden, die prozentual kräftiger, entsprechend der massiveren Impfung wächst (Wildiers, zit. nach Funk). Auch Ungermann (51) weist auf diese Differenzen zwischen dem festen und dem flüssigen Nährboden hin, wenn er schreibt: „daß die Keime durch die Wiederverwendung der aus ihren absterbenden Genossen frei werdenden Verbindungen die für ihr Leben notwendigen Salze zurückgewinnen und so ihr Leben einige Zeit hindurch scheinbar ohne Beihilfe anorgani-

schen Stoffes fortsetzen können." Handelt es sich also bei der Hefe und den IB um ein Mitübertragen organischer Substanz, des V, das durch Auslaugung in die Nährflüssigkeit diffundiert, so gibt es auch für die anorganische Substanz die gleiche Erscheinung: beide beruhen darauf, daß die Zellhülle des toten Keimes permeabel wird. Daß dies Diffundieren anorganischer Substanzen auch für den IB in Frage kommt, läßt sich auch für die Rolle des Eisens vermuten.

Hier möchte ich, unter Hinblick auf die entgegenstehenden Ansichten in der Literatur (Weichardt, Braun, Davidsohn) darauf hinweisen, daß infolge dieser Unterstützung lebender Keime durch die Extrakte aus toten Keimen (es ist dabei gleich, ob man die Bakterien vorher einem Extraktionsverfahren unterwirft, oder ob man die toten Leiber vom Nährboden selbst extrahieren läßt) Untersuchungen mit flüssigen Nährböden an sich zwar vorzuziehen sind wegen der viel einfacheren Handhabung, daß sie aber einwandfrei wohl nur in der Form des Einzellverfahrens angewendet werden dürften. Deshalb kann man die Ergebnisse wohl auch nur als bedingt beweiskräftig erachten. Wenn man auch mit Agar, infolge der Verteilungsschwierigkeiten und ähnlichem, mit weniger idealen Verhältnissen zu tun hat, muß man doch wohl heute noch den festen Nährboden für Stoffwechselversuche als geeigneter ansehen, wenn die Bakterien in Form einer dünnen Emulsion zur Erzielung von Einzelkolonien geimpft werden. Die Gefahr der Zusammenklumpungen kann man dann ziemlich vermeiden. Außerdem lassen sich beim IB insbesondere Kontrollen ansetzen, daß man blut- und eisenfreien Agar und auch gute Levinthal-Platten mit der zu verwendenden Aufschwemmung beimpft. Findet man bei tagelanger Bebrütung, daß selbst bei mikroskopischer Betrachtung keine Koloniebildung auf Agar, dagegen eine Entwickelung gleichgroßer Kolonien auf Levinthal-Agar eingetreten ist, dann ist der Schluß erlaubt, daß die Aufschwemmung der IB dünn genug war, um lauter einzelne Keime auf der Platte lediglich dem Einfluß des Nährbodens auszusetzen, und daß eine Beeinflussung durch die gleichzeitig vorhandenen toten Keime außer dem Bereich der Wahrscheinlichkeit liegt, sodaß also die speziellen Eigenschaften des Nährbodens das Wachstum herbeiführen. Unter diesen Umständen ist dann wohl die Teradasche Methodik, die Koloniegröße zu messen und und dadurch den Gehalt an wachstumsfördernden Substanzen zu bestimmen, das Gegebene.

Was nun die festen Nährböden mit Zusatz abgetöteter Bakterien anbelangt, so sind sie auch vielfach einer Kritik zu unterziehen, und zwar von unserm modernen Vitaminstandpunkt aus. Zunächst fehlt meist ein Hinweis auf die Beimpfungstechnik (dicker Aufstrich oder Emulsion?, Abimpfen von der Levinthal-Platte mittels erkalteter Nadel zur Vermeidung der Mitnahme von Nährboden?) andererseits ist der Zusatz zu den Nährböden meist quantitativ derartig stark — Cantani verwendete z. B. bis zu 6 Plattenkulturen für eine IB-Platte —, daß man nicht ausschließen kann, daß eine eventuelle Steigerung des Wachstums nur dadurch eingetreten ist, daß das näher verwandte Bakterieneiweiß leichter zum Körperaufbau zu verwenden war als das Fleischwasser, während als wachstumsfördernde Stoffe die Inhalte der mitübertragenen toten Keime ausreichten. Man kann jedenfalls nicht auf eine bestimmte, den Bakterien eigentümliche wachstumsfördernde Substanz aus diesen Ver-

suchen schließen. Will man das und will man gleichzeitig den V-Charakter betonen, dann muß man feststellen, daß kleinste Mengen, die als Nährsubstanz nicht mehr in Frage kommen, diese Wachstumssteigerung bedingen. Aus diesem Grunde habe ich bei meinen Versuchen die sehr dünne Aufschwemmung des Friedländer-Bazillus verwendet, mit dem Erfolge, daß sich trotz der geringen Menge zwar eine durchgehend starke Beeinflussung der Ammenkeime, vor allem der V-Keime, bemerkbar machte, die teilweise innerhalb von 5—6 Std. zum Ueberwuchern der ganzen Platten führte, daß ferner in einigen Fällen eine geringe Verstärkung der lebenden Friedländer-Kolonie eintrat, daß aber im übrigen ein Einfluß auf den IB spontan ohne Vermittelung der Ammenkeime niemals konstatiert werden konnte. Dieser Befund entspricht auch früheren, bisher nicht veröffentlichten Versuchen, in denen ich bei Zusatz von Bakterienemulsionen (1 Std. bei 60° sterilisierte) Coli-, Typhus-, Paratyphus A- und B-, Ruhrbazillen u. a. niemals einen Wachstumseinfluß auf den IB feststellen konnte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der verwendete Zusatz der Friedländer-Emulsion nur für die V-Keime einen starken Wachstumsreiz bedeutete, daß stärkerer Blutgehalt dabei ausgesprochen hemmend wirkte, und daß ein fördernder Einfluß auf die anderen Ammenkeime fast nur dadurch festzustellen war, daß bei Friedländer-Zusatz das Ammenwachstum der IB erheblich kräftiger wurde infolge V-Produktion als bei Zusatz von Traubenzucker, der viel weniger wirkte, während die IB-Kolonien als solche auf den unbeeinflußten Plattenteilen nicht größer waren, als auf der entsprechenden Blutagarplatte ohne Zusatz. Einzig bei dem Friedländer schien bei einzelnen Platten ein gewisser Reiz zum verstärkten Wachstum mit vermehrter Schleimproduktion vorzuliegen; eine ganz ähnliche Wirkung ging von dem Kartoffelwasser aus, so daß ich auf eine gemeinsame vitaminähnliche Komponente schließe.

In Zusammenhang damit ist auf den Unterschied zu dem wachstumsfördernden Einfluß des Traubenzuckers hinzuweisen: gegenüber der stark lebenssteigernden Wirkung des Friedländer-Zusatzes bewirkt der Traubenzucker eine wesentlich geringere Vermehrung, die auch nur in entsprechend geringem Grade von einer Verstärkung der V-Produktion gefolgt ist. Ich schließe daraus, daß er in diesen Versuchen, bei denen die Ammenkeime auch ohne ihn sehr gut wachsen, nicht lebensnotwendig ist, wie das Vitamin für die IB, sondern nur wachstumserleichternd wirkt. Diese Wachstumserleichterung findet aber nicht bei allen Bakterien statt — ich habe z. B. mehrfach erwähnt, daß Traubenzuckerzusatz auf einigen Platten direkt hemmend auf die IB wirkte, sondern es scheint nur bei Bakterien einzutreten, die an sich eine erhebliche Fähigkeit haben, Stoffe aus dem Nährboden zu assimilieren. Man findet darin also einen qualitativen Unterschied zwischen Traubenzucker und Friedländerwirkung, insofern, als Traubenzucker die V-Wirkung nicht zu ersetzen vermag. Das primär Wachstumsfördernde ist das Vitamin, wenn es auch nur in geringen Mengen im Nährboden vorhanden ist; andere Stoffe können erst sekundär das Wachstum erleichtern. Da die zugesetzte Friedländer-Emulsion auf die Ammenkeime intensiv för-

dernd wirkt, auf die IB jedoch erst durch die Vermittlung der Ammen, kann man wohl die Bakterien in ihrem Verhalten zu den Vitaminen in mehrere Gruppen teilen, die im folgenden kurz charakterisiert werden mögen:

1) Während die meisten Bakterien mit den geringen, fast regelmäßig im Nährboden vorhandenen Vitaminmengen (nach Funk) auskommen können, bedarf es für eine Anzahl anderer, anspruchsvollerer Keime noch außerdem eines besonderen Zusatzes von größeren oder geringeren Mengen **frischen** Vitamins. Zu dieser Gruppe gehören wahrscheinlich die Meningokokken (Lloyd), Gonokokken (Cole und Lloyd), Streptokokken (Mueller, Freedman und Funk) und sicher die Klasse der sog. hämophilen Bakterien (Davis, Rivers und Poole, Thjötta und Avery, Agulhon und Legroux, Legroux und Mesnard, Tinti, Knorr, Kollath). Man darf diese Keime wohl zusammenfassen als die obligat vitaminbedürftigen Bakterien. Sie scheinen außerdem das gemeinsame Kennzeichen zu haben, daß sie für ihre Existenz und ihre Vermehrung ausschließlich auf den Tierkörper angewiesen, also gleichzeitig obligate Parasiten sind. Auch in der Biologie des Diphtheriebazillus spielen nach den Untersuchungen von Leichtentritt und Zielaskowski akzessorische Nährstoffe eine Rolle. Es soll nicht verschwiegen werden, daß andere Forscher, z. B. Weichardt, die Wachstumsförderung unspezifischen Organbestandteilen zur Last legen.

2) Die zweite, größte Gruppe kommt mit dem im Nährboden vorhandenen V nicht nur aus, sondern scheint, wie aus dem Ammeneinfluß auf die IB hervorgeht, in mehr oder weniger hohem Maße die Fähigkeit zu haben, neues Vitamin zu produzieren. Den ersten Nachweis für die V-Produktion für Bakterien führten Pacini und Russel bei der Untersuchung des Typhusbazillus. Allerdings scheint es bei dieser Gruppe notwendig zu sein, daß eine geringe Ausgangsmenge von Vitamin im Nährboden vorhanden ist; diese Bakterien haben also wohl nicht die Fähigkeit, ganz aus eigener Kraft Vitamine zu produzieren. Nach Gehlen kommt die „Ammeneigenschaft mit wenigen Ausnahmen [Bac. pyocyaneus und subtilis (Wolf)] anscheinend allen pathogenen und nicht pathogenen Keimen zu, dagegen nicht den IB". Diese Gruppe gleicht in der V-Produktion somit dem Verhalten der Hefearten, die nur bei Vorhandensein von Vitamin D im Nährboden das Vitamin B zu produzieren vermag (Funk).

Da zu dieser Gruppe auch die sämtlichen Darmbakterien, mit Ausnahme des Bac. subtilis (Wolf) gehören, scheint der Gedanke erlaubt, daß den Darmbakterien für den Vitaminstoffwechsel des Einzelwesens vielleicht eine wichtige Rolle zukommt. Zur Klärung dieser Fragen bedarf es der Aufzucht von keimfrei gewonnenen Tieren, die nicht nur keimfrei, sondern auch vitaminfrei ernährt werden müßten. Die eigentlichen Versuchstiere müßten dann teilweise bestimmte, vorsichtig abgetötete, andere wieder bestimmte lebende Bakterien, möglichst Darmbakterien der betreffenden Tierart, erhalten. Während seit Pasteur im allgemeinen der Standpunkt eingenommen wurde, daß die Darmbakterien von lebenswichtiger Bedeutung für die Tiere seien, ist es Küster gelungen, eine Ziege 12 Tage keimfrei zu erhalten unter Gewichtszunahme. Dann wurde

das Tier zufällig durch Heubazillen infiziert, was für das weitere Gedeihen des Versuchstieres ohne den geringsten Einfluß war. Die Ernährung bestand aus Milch und Haferschleim, war also wohl sehr vitaminreich! Der Versuch wurde am 35. Tage abgebrochen. Von großem Interesse ist nun, vom Vitaminstandpunkt aus betrachtet, der Versuch von Grünmandel und Leichtentritt, die durch Gaben von 1—2 g Heubazillen den Skorbut bei Meerschweinchen zu verhindern suchten, allerdings erfolglos; vermutungsweise wegen unzureichender Dosierung. Diese Versuche, die ich hier nur kurz erwähnen kann, sind aber für die Lehre von der Wirkung der Darmbakterien von einer solchen Wichtigkeit, daß er mit anderen Stämmen aus anderen Bakteriengruppen (Coli, Proteus) wiederholt zu werden verdient. Leichtentritt und ich werden noch genauer auf diese Frage eingehen.

Für diese zweite Gruppe scheinen auch gewisse andere Körper unter Umständen wachstumserleichternd wirken zu können, z. B. Traubenzucker. Doch handelt es sich dann höchstwahrscheinlich darum, daß diese Stoffe besonders leicht resorbiert werden. Einen Beweis gegen die Vitaminlehre bildet die wachstumsfördernde Wirkung des Traubenzuckers auf die Ammenbakterien nicht, wie ich eben auseinandergesetzt habe. Das könnte erst stattfinden, wenn ausdrücklich durch Tierversuche nachgewiesen ist, daß eine Vitaminwirkung vom Nährboden aus oder durch Verunreinigung des verwendeten Stoffes mit Vitamin sicher auszuschließen ist.

3) Es ist ferner daran zu denken, daß es noch eine dritte Gruppe von Bakterien geben mag, die von sich heraus Vitamin zu synthetisieren vermögen, aus anorganischen oder organischen Verbindungen. Funk glaubt auch an diese Möglichkeit, wenn auch bisher noch keine Arten sicher nachgewiesen sind. Er schreibt dazu: „Sollte es dennoch Bakterien geben, die diese Eigenschaft (der Vitaminsynthese, d. Verf.) zeigen, so würde ihnen die größte biologische Rolle zukommen, denn sie müßten als die Vitaminverschaffer der Natur betrachtet werden.“ Bisher ist aber nur aus theoretischen Gründen auf die Existenz dieser Gruppe zu schließen; sie wäre ein Analogon zu der Tätigkeit der Knöllchenbakterien, die anorganischen Stickstoff in organische Verbindungen überzuführen vermögen.

Alle diese Erörterungen beziehen sich nur auf das Wachstumsvitamin der Bakterien, von dem wir auch noch nicht wissen, ob es mit dem hefewachstumsfördernden Vitamin D identisch ist (Funk). Welche Beziehungen vollends zwischen Vitaminen und Pathogenität bestehen, oder ob sich aus der Frage der Mischkolonien Rückschlüsse auf die spezielle Pathogenität des IB schließen lassen, ist noch ganz unklar. Es liegen erst sehr wenig Untersuchungen darüber vor. So haben Bunker, Davis und Ferry nachgewiesen, daß Vitaminreichtum für den Diphtheriebazillus toxinbildend wirkt; Ascoli und seine Schule glauben dagegen, daß durch Züchtung sowohl im vitaminfreien Nährboden als im vitaminarmen Tierkörper abgeschwächte pathogene Mikroorganismen eine Virulenzsteigerung erfahren, daß sie eine für den normalen Organismus tödliche Infektion hervorzurufen imstande sind.“ Ascoli glaubt an die Wirksamkeit einer besonderen Substanz: Exaltin. Man muß aber wohl daran denken, daß der vitaminverarmte Tierkörper auch gegen wenig virulente Stämme empfindlicher ist,

und daß somit erst mittelbar eine Steigerung der Pathogenität erfolgt. Die Versuche von Grünmandel und Leichtentritt lassen einen derartigen Zusammenhang als durchaus wahrscheinlich erscheinen. Eine Klärung dieser mit der Vitaminlehre zusammenhängenden Fragen wird aber doch erst möglich sein, wenn es gelungen ist, wenigstens ein Vitamin rein darzustellen. Infolge des erheblich verkürzten Nachweises durch das Bakterienwachstum gegenüber dem Tierversuch ist es vielleicht möglich, daß das hier in Frage kommende Vitamin als erstes aufzufinden sein wird. Die Erscheinung des Ammenwachstums aber scheint berufen, in diesen Untersuchungen eine wesentliche Rolle zu spielen.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1) In dieser Arbeit sind Versuchsreihen beschrieben, in denen die für das Wachstum des IB bisher bekannten Faktoren systematisch untersucht werden in ihrem Zusammenhang mit dem Ammenwachstum.

2) Ein „Ammenwachstum" (Neisser) tritt nur dann ein, wenn der betreffende Ammenkeim imstande ist, aus gewissen kolloidalen Eisenverbindungen im Agar die für das Wachstum des IB notwendige Substanz zu synthetisieren, und wenn er außerdem in geringem Maße vitaminähnliche Substanzen produziert.

3) Ein „Riesenwachstum" (Grassberger) tritt dagegen auf, wenn die — eisenhaltige — Blutfarbstoffkomponente ausreichend und in geeigneter Form im Nährboden vorhanden ist, und wenn die zu untersuchenden Ammenbakterien die Fähigkeit haben, vitaminähnliche Substanzen zu produzieren, die in den umgebenden Nährboden diffundieren können (Davis, Knorr, Gehlen).

4) Wenn unerhitzter Blutagar verwendet wird, auf dem auch ein Riesenwachstum in den ersten 24 Std. eintritt, dann ist der Grund wahrscheinlich auch in der V-Produktion der Ammen zu suchen. Das Blut-V tritt erst wesentlich langsamer aus den roten Blutkörperchen aus und bewirkt dann die bekannte Erscheinung des Nachwachstums. Auf diesen Diffusionen beruht das sog. „Reifen der Blutplatten".

5) Wenn V- und X-Substanz in ausreichendem Maße vorhanden sind, kann bei für den untersuchten IB-Stamm nicht geeignetem Alkaleszenzgrad durch Säure- oder Alkaliproduktion der Ammen eine Korrektion des Nährbodens vorgenommen werden, durch die dann ebenfalls ein „Riesenwachstum" der IB-Kolonien auftritt.

6) Ein optimaler Blutagar-Nährboden (ähnlich dem Levinthal-Agar) kann durch Zusatz von Traubenzucker oder Friedländer-Emulsion in seiner Geeignetheit für den IB gestört werden und dann doch das Riesenwachstum zeigen.

7) Ein Nährboden, auf dem keine Wachstumsbeeinflussung durch Ammen eintritt, ist als optimal zu betrachten (Knorr).

8) Neben einer Verbesserung des Nährbodens durch Ammen kann unter bestimmten Umständen auch eine Verschlechterung durch die-

selben Keime eintreten. Dann bilden sich Hemmungszonen für den IB um die betreffende Ammenkolonie:

a) Ueberschüssige Säure- oder Alkalibildung kann den Nährboden für den IB ungeeignet machen, wenn die Nährbodenreaktion gerade an der Grenze der Brauchbarkeit steht.

b) Durch peptonisierende Fermente kann eine Zerstörung der 3. ernährenden Substanz[1]) (Kollath) unter gleichzeitiger Bildung hemmender Stoffe eintreten.

Jenseits dieser gehemmten Zonen kann unbeschadet ein Riesenwachstum der IB auftreten. Daraus ist zu schließen, daß die V-Substanz diesen Nährbodenschädigungen gegenüber resistent ist. Die Erscheinung zeigt äußerlich eine ausgesprochene Aehnlichkeit mit dem „Randwulst" und den „keimfreien Höfen" (Saxl, Löhner) bei oligodynamischen Metallwirkungen.

9) Ammenbakterien können sowohl durch Traubenzuckerzusatz wie durch Friedländer-Emulsion eine Wachstumsverstärkung erfahren. Der Unterschied besteht darin, daß es sich bei dem Traubenzuckerzusatz nur um eine geringfügige Steigerung handelt, so daß er lediglich als wachstumserleichternd, weil leichter assimilierbar, zu betrachten ist. Vorhandensein von geringen V-Mengen im Nährboden ist dabei aber Vorbedingung. Vitaminzusatz (frisch) dagegen wirkt selbst in geringen Mengen erheblich stärker. Die Intensität der Wirkung ist sowohl durch eine Wachstumsverstärkung des Ammenkeimes selbst, wie durch eine Verstärkung der Vitaminproduktion gekennzeichnet. Letztere äußert sich durch eine Zunahme der Größe der IB-Kolonien. Stärkerer Blutgehalt des Nährbodens wirkt dabei hemmend auf die Wachstumsförderung durch die vitaminähnlichen Substanzen, auch wenn es sich um gekochtes Blut handelt.

Zum Schlusse der Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geheimrat Professor Dr. Pfeiffer für sein Interesse und die Anregung während meiner Arbeit meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

1) Agulhon u. Legroux, Compt. rend. T. 167. p. 597. — 2) Allen, Lancet. 1910. Vol. I. p. 1264. — 3) Ascoli, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 76. 1924. S. 225. — 4) Ayers and Mugde, Journ. of Bact. Vol. 7. 1922. p. 449. — 5) Cantani, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 28. 1900. S. 743. — 6) Ders., Ibid. Bd. 32. S. 692. — 7) Ders., Ztschr. f. Hyg. Bd. 36. 1901. — 8) Davidsohn, Biochem. Ztschr. Bd. 150. 1924. S. 304. — 9) Davis, Journ. inf. Dis. Vol. 21. 1917. p. 392. — 10) Ders., Ibid. Vol. 23. 1918. p. 248. — 11) Ders. and Ferry, Journ. of Bact. Vol. 4. 1919. p. 217. — 12) Fildes, Brit. Journ. Exp. Pathol. Vol. 4. 1923. p. 265. — 13) Fichtner, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. S. 374. — 14) Fleming, Lancet. 1919. p. 138. — 15) Freedman and Funk, Proceed. Vol. 19. 1921. p. 198. — 16) Dies., Journ.

1) Unter 3. ernährender Substanz verstehe ich die zum Körperaufbau notwendigen Stoffe, mit Ausnahme von Vitamin und X-Substanz. Ob auch anorganische Salze dazu gehören, müssen weitere Versuche zeigen.

Metabol. Res. Vol. 1. 1922. p. 457. — 17) Funk, Die Vitamine. 3. Aufl. München (O. Bergmann) 1924. — 18) Gehlen [Inaug.-Diss.]. Erlangen 1923. — 19) Ghon u. v. Preyß, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1902. — 20) Graßberger, Ztschr. f. Hyg. Bd. 25. 1897. S. 453. — 21) Grünmandel u. Leichtentritt, Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 107. 1924. — 22) Goy, Ber. über d. ges. Physiol. Bd. 15. 1923. S. 139; Compt. rend. T. 174. 1922. — 23) Huber, Ztschr. f. Hyg. Bd. 15. — 24) Jakoby u. Frankenthal, Biochem. Ztschr. Bd. 122. 1921. S. 100. — 25) Kalkbrenner, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 87. 1921. S. 277. — 26) Kondo, Ber. über d. ges. Physiol. Bd. 17. 1923. S. 90. — 27) Knorr, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924. S. 371 u. 385. — 28) Ders., Weichardts Ergebn. Bd. 6. 1923. — 29) Kollath, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. — 30) Kruse, Allg. Mikrobiologie. Leipzig (Vogel) 1910. — 31) Küster, 6. Tagung d. Mikrobiol. 1912. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 54. — 32) Leichtentritt, Berl. klin. Woch. 1921. S. 631. — 33) Ders., Ztschr. f. d. ges. experim. Med. 1922. S. 704. — 34) Ders. u. Zielaskowski, Mon. f. Kinderheilk. Bd. 26. 1923. — 35) Levinthal, Kuszinski u. Wolff, Aetiol., Epidemiol. usw. der Grippe. München u. Wiesbaden (Bergmann) 1921. — 36) Legroux et Mesnard, Compt. rend. T. 170. p. 901. — 37) Löhner, Wien. klin. Woch. 1919. S. 911. — 38) Luersen [Inaug.-Diss.], Königsberg 1903. — 39) Ders., Ztschr. f. Hyg. Bd. 35. 1904. S. 434. — 40) Meunier, Baumgartens Jahresberichte 1898. Ref. Arch. f. Kinderheilkunde. Bd. 28. — 41) Mueller, Journ. of Bact. Vol. 7. 1922. p. 309 and 337. — 42) Neißer, Dtsch. med. Woch. 1903. S. 462. — 43) Pfeiffer, Dtsch. med. Woch. 1892. — 44) Ders., Ztschr. f. Hyg. Bd. 13. 1892. — 45) Pacini and Russel, Journ. Biol. Chem. Vol. 34. 1918. p. 43. — 46) Putnam and Gay, Journ. of med. Rés. Vol. 42. 1920. p. 1. — 47) Pringsheim, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 51. S. 72. — 48) Rivers, Journ. of Bact. Vol. 7. 1922. p. 580. — 49) Saxl, Wien. klin. Woch. 1917. S. 714—718. — 50) Seitz, Ztschr. f. Hyg. Bd. 71. 1912. — 51) Savini u. Savini-Castano, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 60. S. 493. — 52) Terada, Kitasato-Arch. Bd. 5. 1922. S. 34 u. 62. — 53) Thjötta, Journ. exper. Med. Vol. 33. 1921. p. 763. — 54) Ders. and Avery, Ibid. 1921. p. 97.— 55) Dies., Ibid. Vol. 34. 1921. p. 455. — 56) Tinti, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 90. 1923. S. 401. — 57) Tokugana, Dtsch. med. Woch. 1920. S. 1357. — 58) Ungermann, in Kraus-Uhlenhuth, Mikrobiolog. Technik. 1. Teil. S. 732 f. Berlin und Wien (Urban und Schwarzenberg) 1923. — 59) Walker, Journ. of Physiol. Vol. 56. 1922. — 60) Wolf, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 84. S. 241. — 61) Wyon, Journ. of Pathol. and Bact. Vol. 26. 1923. p. 441. — 62) Weichardt, Ztschr. f. Hyg. Bd. 104. — 63) Ders., Klin. Woch. Jahrg. 3. Nr. 19. — 64) Ders., Wien. klin. Woch. 1924. Nr. 29/30.

Erklärung der Tafelabbildungen (eigene Aufnahmen des Verf.).

Tafel I.

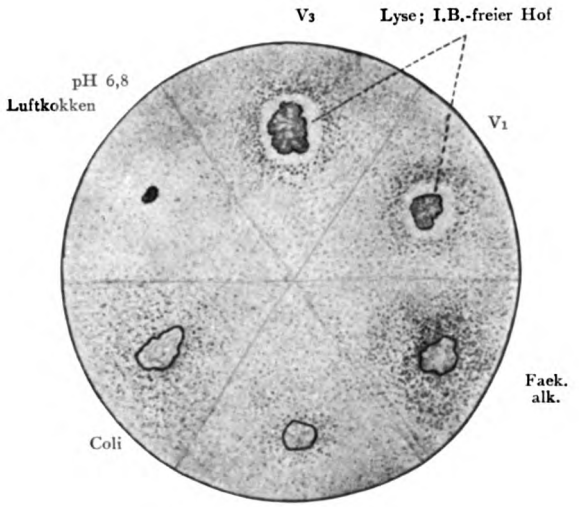
Fig. 1 zeigt die Zeichnung nach einer Platte mit 5 Proz. im Agar gekochten Menschenblut bei Zusatz von Friedländer-Emulsion und bei pH 6,8. Um die deutlich markierten Kolonien der Ammenkeime sieht man in Punkten die Anordnung und Größe der IB-Kolonien. An den Seiten die Bezeichnung der betreffenden Ammenkeime.

Fig. 2 zeigt eine Abbildung des typischen „Riesenwachstums" (Graßberger) auf einer Platte mit 3 Oesen Blutextrakt bei pH 7,0. Die dunkle Kolonie in der Mitte ist eine Kolonie des Baz. Friedländer. (Aufnahme mit durchfallendem Licht, Vergrößerung etwa 10fach).

Tafel II.

Fig. 3 zeigt eine kleine Mischkolonie des Luftcoccus und der IB aus einer späteren Versuchsreihe mit anderer Beimpfungstechnik. Klatschpräparat. (Vergrößerung 1000fach.) Die kranzförmige Anordnung der IB um die in der Mitte befindlichen grampositiven Kokken ist deutlich.

Fig. 4 zeigt eine Mischkolonie des Luftcoccus und der IB. Diese sind unmittelbar am Rande als heller Kranz und auch als kleine erhabene Kolonien (als helle Flecken auf dem Photogramm) im Bereiche der Luftkokkenkolonie gewachsen. Eisenhaltiger Nährboden, pH 7,4.



Friedländer 24 Std. alte Platte.

Fig. 1.

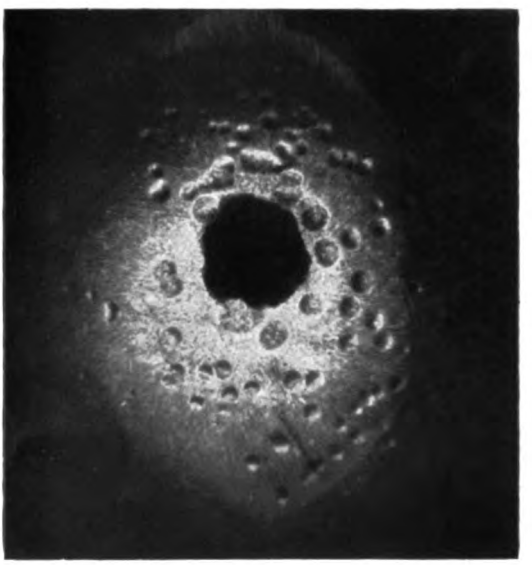


Fig. 2.

THE LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS

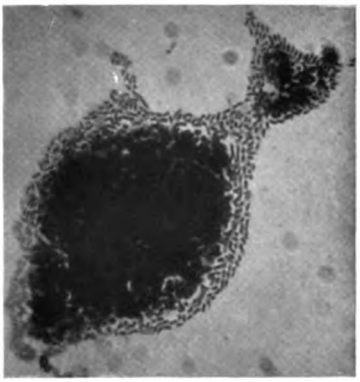


Fig. 3.

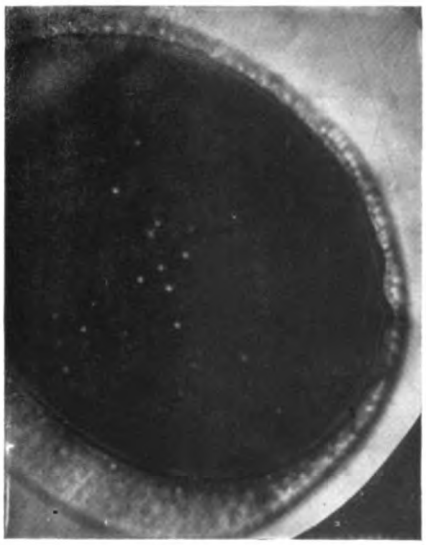


Fig. 4.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

THE LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS

Nachdruck verboten.

Eine vereinfachte Methode für Anaërobenzüchtung.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. **Werner Kollath** und Dr. **Gerhard Quast**, Assistenten.

Mit 1 Abbildung im Text.

Im Folgenden beschreiben wir einen kleinen Apparat, der die Verwendung jedes festen und flüssigen Nährbodens zur Anaërobenzüchtung gestattet. Das Verfahren ist folgendes: Zwei Reagenzgläser werden in ihrem oberen Teil durch ein offenes Zwischenstück verbunden, wie die Abbildung zeigt, und in üblicher Weise sterilisiert. Das eine Röhrchen wird mit dem zu verwendenden Nährboden beschickt, in das andere kommt die Sauerstoff absorbierende Substanz. Anfangs verwendeten wir zur Sauerstoffabsorption das gewöhnlich gebrauchte alkalische Pyrogallol; doch ergab die Prüfung, daß Methylenblau in aufgekochter Bouillon dabei erst in 3—4 Tagen entfärbt wurde. Wir sahen uns deshalb nach einem kräftiger wirkenden Mittel um und versuchten auf den Rat von Herrn Prof. Meyer vom Chemischen Institut Breslau eine stark alkalische Lösung von hydroschwefligsaurem Natrium ($Na_2S_2O_4$). Dieses selbe Mittel ist bereits 1911 von Kulka zur Züchtung von Anaëroben empfohlen worden, hat sich aber bisher noch nicht einzubürgern vermocht. Kulka gibt folgende Beschreibung:

„Es ist in Wasser relativ leicht löslich und reagiert am besten in alkalischer Lösung mit Sauerstoff nach der Gleichung: $Na_2S_2O_4 + H_2O + O = NaHSO_3 + NaHSO_4$. Ein Gramm dieser Substanz würde daher rund 64 ccm O von 0^0 und 760 mm Druck absorbieren. Bei der Verwendung des Natriumhydrosulfits ist noch zu berücksichtigen, daß dasselbe trocken aufzubewahren ist, da es sich in feuchtem Zustande mit der Zeit zersetzt und unwirksam wird, während es sich trocken aufbewahrt sehr gut hält. Ebenso soll die Temperatur des zur Lösung verwendeten Wassers 40—50^0 nicht übersteigen, da sonst gleichwie beim Ansäuren mit Schwefelsäure, eine Zersetzung unter SO_2- bzw. H_2S-Bildung erfolgen kann. Zum Unterschiede von Pyrogallol verläuft der Absorptionsvorgang ebenso schnell in der Kälte wie in der Wärme." Ueber unsere Erfahrungen mit diesem Mittel können wir bezüglich seiner Eigenschaften noch folgendes hinzufügen: Die Substanz wird am besten unmittelbar vor dem Gebrauch nicht in Wasser, sondern in 10proz. Kalilauge gelöst. Die Lösung muß geruchlos (SO_2-Abspaltung!) sein; sie bleibt auch nach Sauerstoffabsorption farblos, nur scheiden sich Hydroxyde ab, die sich zu Boden setzen.

Die Berechnung der zu verwendenden Menge gestaltet sich folgendermaßen: Wenn 1 ccm der Substanz 64 ccm O zu binden vermag, dann sind für die Doppelröhrchen, die etwa 55 ccm Rauminhalt haben, also 11 ccm O enthalten, rund $^1/_6$ g der Substanz notwendig; für die Lentz-Platte, mit einem Rauminhalt von rund 100 ccm demgemäß $^1/_3$ g. Stellt man eine 20proz. Lösung in 10proz. Kalilauge her, dann sind die erforderlichen Mengen von Natriumhydrosulfit in 0,5 bzw. 1,0 ccm der Lösung enthalten. Doch empfiehlt es sich, eine größere

Menge zuzusetzen, wenn man mehrfach Kultur aus dem Röhrchen entnehmen will. Sobald nämlich die Röhrchen luftdicht mit Paraffin verschlossen sind, hört die O-Absorption nach Verbrauch der im Röhrchen enthaltenen 11 g O auf und die nicht oxydierte Substanz bleibt unverändert. Wird das Kulturröhrchen dann geöffnet, und nach Entnahme wieder verschlossen, tritt automatisch wieder die O-Absorption ein; man braucht also keine weiteren Vorkehrungen zu treffen, um aufs neue O-Freiheit zu erzielen, wenn man von Anfang an größere Mengen, etwa 10 ccm der 20proz. Lösung, zugesetzt hat. Die Tatsache, daß die Sauerstoffabsorption auch bei Zimmertemperatur stattfindet, gewährt die Möglichkeit, auch bei niedriger Temperatur wachsende Anaerobier mit diesem Verfahren zu züchten.

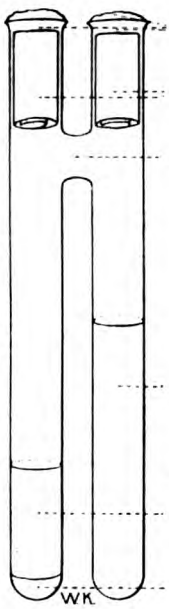


Fig. 1.

Für die Technik des Verfahrens ist noch zu bemerken, daß die Nährböden ebenso wie sonst bei der Anaërobenzüchtung behandelt werden müssen, also Aufkochen der Bouillon usw. Die Stopfen werden am besten oben glatt abgeschnitten, in die Röhrchen hineingedreht und dann mit verflüssigtem Paraffin übergossen. Herausziehen der Stopfen nach Erwärmen, eventuell mit Korkenzieher.

Auf den Rat von Herrn Geh. Rat Pfeiffer haben wir zur Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche in das Röhrchen mit dem Natriumhydrosulfit entfettete Watte getan, die die Flüssigkeit aufsog. Die Schnelligkeit der Wirkung nahm dadurch erheblich zu: eine dünne Methylenblaulösung in Bouillon wurde ohne Watte in 24 Std., mit Watte bereits in etwa 12 Std. entfärbt. Das Wachstum des Tetanusbazillus trat entsprechend in dem Röhrchen mit Watte weit schneller, in schon 12—18 Std. ein, sonst erst nach frühestens 24 Std. Man kann auch statt der Watte gefaltetes Filtrierpapier verwenden.

Das Wachstum der untersuchten Anaërobier gestaltete sich derart, daß in Bouillon (1proz. Traubenzucker) Bac. tetani, Baz. des malignen Oedems, Bac. botulinus und Gasbrand (Fraenkel) in 12—24 Std. sehr üppig mit dickem Bodensatz wuchsen. Auf Schrägagar wuchsen Fraenkel und mal. Oedem in 24 Std., Bac. tetani und botulinus in 36—48 Std. in makroskopisch sichtbaren Kolonien, so daß eine Isolierung leicht möglich war. Sporenbildung und Toxinbildung (beim Tetanus) waren dem Verhalten in Tarozzibouillon gleichwertig.

Auch für die Lentz-Platte ließen sich sehr gute Erfolge feststellen: alle Keime wuchsen in 12—36 Std. in typischen Kolonien, die sich dank der Farblosigkeit des Natriumhydrosulfits leicht mikroskopisch untersuchen ließen. Da man erheblich weniger Zellstoff für den notwendigen einen ccm der Lösung gebraucht, als für die 3 ccm

der Pyrogallollösung, bleibt ein weit größerer Teil der Platte zur mikroskopischen Untersuchung frei. Die Substanz ist also auch darin der sonst verwendeten Pyrogallollösung überlegen.

Zusammenfassung.

Zur Anaërobenzüchtung werden Doppelröhrchen empfohlen, die im oberen Teil durch eine offene Verbindung in Kommunikation stehen. Zur Sauerstoffabsorption dient hydroschwefligsaures Natrium ($Na_2S_2O_4$), das sich dem Pyrogallol in den meisten Versuchen überlegen, sonst gleichwertig zeigte. In der Einfachheit der Anwendung, der Billigkeit und der Raumersparung ist das Verfahren den übrigen Anaërobenverfahren gleichwertig, wenn nicht überlegen [1]).

Literatur.

Kulka, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 59. S. 554.

Nachdruck verboten.

Zur Komplementdosierung bei der Wassermannschen Reaktion.

[Aus dem Institut „Robert Koch" (Serolog. Abteilung: Geheimrat Otto).]

Von Dr. **Hans Munter**, Assistenten am Institut.

Von der Anschauung ausgehend, daß bei der Wassermannschen Reaktion die größere Gefahr darin besteht, daß unspezifische positive Resultate erhalten werden, arbeiteten viele Untersucher einerseits mit relativ hohen Komplementdosen, und andererseits mit Extraktmengen, die an sich (ohne Serumzusatz) keine Hemmung der Hämolyse gaben.

Was die Komplementmenge anbetrifft, so benutzt man in der Regel (nach dem Vorgange von Wassermann, Neißer und Bruck) 10fach verdünntes Meerschweinchenserum. In der Tat hat sich gezeigt, daß bei Verwendung dieser Komplementverdünnung und der üblichen, 4fach erhöhten Ambozeptordosis die Gefahr positiver Fehlresultate fast ganz vermieden werden kann; dafür muß man aber in den Kauf nehmen, daß im großen und ganzen zu schwache Resultate erhalten werden, d. h. daß einzelne sich bei schärferer Arbeitsweise als positiv herausstellende Sera negativ reagieren. Infolgedessen war man bemüht, die Reaktion so zu verstärken, daß möglichst alle Lues-Reagine enthaltenden Sera als positiv erfaßt werden, ohne zugleich die Gefahr der Unspezifität zu erhöhen. Diesem Ziele suchte man auf 2 Wegen näher zu kommen. Der eine führte zur Erhöhung der Extraktdosis bis an die oberste Grenze [vgl. Blumenthal [2])], der andere

1) Die Doppelröhrchen sind in richtiger Ausführung durch die Glasbläserei Paeller, Breslau, Tiergartenstr. 85/87 zu beziehen.

2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 101. 1923.

zur schärferen und detaillierten Einstellung des Komplementes. So wird z. B. bei der Methode von Kaup das Komplement jedesmal in 5 verschiedenen Dosen einem Gemisch von stets gleichen Mengen Extrakt und Menschenserum zugesetzt; das Komplement wird sowohl mit dem hämolytischen System allein, mit dem Extrakt, einem negativ reagierenden Menschenserum von nicht übernormaler Eigenhemmung, und schließlich gegenüber einem Gemisch der beiden letzteren genau titriert. Hand in Hand mit dieser Komplementeinstellung geht bei Kaup eine besondere Auswertung der Extrakte einher, die in manchen Punkten von der sonst gebräuchlichen abweicht.

Der Zweck dieser regelmäßig vorzunehmenden, allerdings zeitraubenden Vorversuche ist der, sich den Verschiedenheiten des zur Verwendung gelangenden Meerschweinchenkomplementes anzupassen und einen Ueberschuß von Komplement zu vermeiden. Das gleiche bezweckte die „Staatliche Anleitung für die Ausführung der Wassermannschen Reaktion vom 11. Juli 1919", wenn sie außer regelmäßig mit den Extrakten vorzunehmenden Vorversuchen vorschrieb, daß im Hauptversuch mit einem von den 3 (zur Untersuchung benötigten) Extrakten auch mit der halben Komplementmenge (1/20) gearbeitet werden sollte. Es war also im Hauptversuch nicht nur mit 2 Komplementverdünnungen (1/10 und 1/20) zu arbeiten, sondern es mußte auch im Vorversuch die Gebrauchsdosis des Ambozeptors doppelt festgestellt werden, und zwar das eine Mal mit 1/10, und das andere Mal mit 1/20 verdünntem Komplement.

Gegen diese Vorschrift sind verschiedentlich Bedenken erhoben[1]). Uns interessieren hier folgende Einwände: einmal, daß die Extraktvorversuche nur mit einem Extrakt auszuführen sind; zum zweiten, daß die Anstellung der Reaktion in gewissem Grade durch die Verwendung zweier verschiedener Komplementdosen erschwert wird, und zum dritten, daß bei der Verwendung von 1/20 Komplement zwar einzelne positive Reaktionen mehr auftreten, daß diese aber häufig unspezifisch sind und daher keine diagnostische Bedeutung besitzen.

Die Erfahrungen auf der Serumkonferenz in Kopenhagen sprachen nun dafür, daß vielleicht dem genau austitrierten Komplement größere Bedeutung beizumessen ist als der Verwendung mehrerer Extrakte. Da indessen die Methodik der einzelnen Untersucher sehr verschieden war, so haben wir zunächst Versuche aufgenommen, um zu prüfen, ob sich auch bei dem in Deutschland eingeführten Verfahren (Originalmethode Wassermanns) ohne weitere umständlichere Vorversuche eine Komplementdosis ermitteln läßt, die uns, ohne unspezifische Resultate zu geben, möglichst viele Syphilissera positiv anzeigt. Zu diesem Zwecke haben wir 3 Serien von 500 Seren mit verschiedenen Komplementdosen untersucht, wobei in allen Seren zwei bestimmte Extrakte verwendet wurden, und zwar:

a) der Luesleberextrakt (mit Meerschweinchenherzzusatz) Nr. XXV unserer Abteilung (Verdünnung 1:6), und b) der uns von Herrn Professor Sachs (Heidelberg) liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellte cholesterinierte Rinderherzextrakt S. No. II (Verdünnung 1:6; Ausführung der Verdünnung nach Vorschrift von Sachs).

Mit diesen beiden genau bekannten und eingestellten Extrakten wurde nun die Wassermannsche Reaktion in der Weise ausgeführt, daß gleichzeitig mit der üblichen Komplementverdünnung 1/10

1) Vgl. Manteufel, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 1924. Beih. S. 305.

in Serie I die Komplementverdünnung 1/15,
in Serie II die Komplementverdünnung 1/20 zur Verwendung kam, während
in Serie III die Komplementverdünnung 1/10 und eine in einem zweiten Vorversuch bestimmte, gerade noch lösende Komplementmenge benutzt wurde.

Bezüglich der Ausführung der Versuche mit 1/15 (Tabelle I) und 1/20 (Tabelle II) Komplement bedarf es keiner weiteren Erklärung. Die Versuche waren in der Weise angestellt, daß der Vorversuch mit 1/10-Komplement angesetzt und nach 1 Std. das Resultat abgelesen wurde. Als Gebrauchsdosis für den Hauptversuch wurde in diesen Versuchen das 3fache des Titers gewählt, der im Vorversuch nach 1 Std. glatte Lösung ergab, und mit demselben Ambozeptortiter wurde dann im Hauptversuch auch die Reihe 1/15 und 1/20 Komplement angesetzt [1]).

Was die Austitrierung des Komplementes in der 3. Versuchsreihe (s. Tab. III und V) anbetrifft, so gingen wir dabei in der Weise vor, daß fallende Dosen Komplement mit jedem der beiden Extrakte und normalem Serum (in den üblichen Verdünnungen) unter Benutzung der im Vorversuch ermittelten Ambozeptordosis angesetzt wurden. Als Kontrolle diente eine besondere Reihe mit fallenden Dosen Komplement und Ambozeptor ohne Serum und ohne Extrakt. Als Gebrauchsdosis des Komplementes wurde diejenige Komplementmenge gewählt, die nach 1 Std. bei 37° in den Röhrchen mit Extrakt und negativem Serum gerade noch glatte Lösung ergab. Die Komplementgebrauchsdosis wurde somit für jeden Extrakt gesondert bestimmt. Wir mußten, da diese Dosis für die 2 zur Verwendung kommenden Extrakte nicht immer gleich lag, mitunter mit verschiedenen Komplementmengen im Hauptversuch arbeiten.

Tabelle V zeigt einen derartigen (2.) Vorversuch.

Aus dieser Tabelle ergibt sich zunächst, daß nicht nur (wie im Vorversuch a) 0,25 ccm Komplement 1/10, sondern auch noch 0,1 ccm derselben Verdünnung glatte Lösung erzielte. Die Reihe β zeigt, daß bei Zusatz von negativem Serum bei Extrakt XXV 0,2 ccm Komplement glatte Lösung bewirkte, während bei dem Extrakt S. II hierzu 0,15 ccm genügte (Reihe γ). Im einzelnen schwankte die ermittelte Komplementdosis in erheblichem Grade.

In 31 Versuchen betrug sie statt 0,25 ccm der Verdünnung 1:10
beim E. XXV : 17mal 0,2 ccm; 12mal 0,15 ccm; 2mal 0,1 ccm
„ S. II : 11mal 0,2 „ ; 17mal 0,15 „ ; 3mal 0,1 „

Die Resultate der 3 Versuchsreihen sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt. Die untersuchten Sera sind jedesmal in 3 Gruppen eingeteilt, je nachdem bei den betreffenden Personen nach Ansicht des behandelnden Arztes Lues
a) anamnestisch oder klinisch sicher vorlag,
b) unbestimmt war, oder
c) unwahrscheinlich erschien bzw. negiert wurde.

Bezüglich des Extraktes XXV möchten wir noch bemerken, daß wir bei den vorliegenden Versuchen mit der Verdünnung 1:6 gearbeitet

1) Dieses von unserer gebräuchlichen Methode (4facher Titer) abweichende Verfahren wurde gewählt, um von vornherein einen Komplementüberschuß zu vermeiden.

haben, während wir bei unseren laufenden Untersuchungen ihn in der Verdünnung 1:5 = 0,05 ccm bei Vierteldosen benutzen. Da der Titer unserer Extrakte absichtlich schon so scharf eingestellt ist, daß kein Komplementüberschuß im Reaktionsgemisch restieren soll, so war naturgemäß bei Komplementverdünnung 1:15 das Arbeiten mit der Extraktverdünnung 1:6 (= 0,04 bei Vierteldosen) unmöglich (Tab. I—V).

Tabelle I.
Resultate der WaR. bei Verwendung verschiedener Komplementdosen. Vergleich: Komplementverdünnung 1:10 und 1:15.

Komplement 1:10		Komplement 1:15		Lues	unbestimmte Diagnose	keine Lues
E. XXV 0,04	S. II 1:6	XXV 0,04	S. II 1:6			
—	+	—	+	3	2	3
—	—	—	+	1	3	1
+	—	+	+	14	4	1
—	—	+	+	4	4	0
—	—	+	—	16	21	2
—	+	+	+	4	1	0
+	—	+	—	15	12	1
—	—	—	—	0	0	242
+	+	+	+	146	0	0

Tabelle II.
Vergleich: Komplementverdünnung 1:10 und 1:20.

Komplement 1:10		Komplement 1:20		Lues	unbestimmte Diagnose	keine Lues
E. XXV 0,04	S. II 1:6	XXV 0,04	S. II 1:6			
—	+	—	+	0	0	0
—	—	—	+	1	3	0
+	—	+	+	15	9	0
—	—	+	+	13	15	6
—	—	+	—	15	51	6
—	+	+	+	3	5	1
+	—	+	—	7	14	1
—	—	—	—	0	0	202
+	+	+	+	133	0	0

Tabelle III.
Vergleich: 1:10 verdünntes und austitriertes Komplement.

Komplement 1:10		Komplement austitriert		Lues	unbestimmte Diagnose	keine Lues
E. XXV 0,04	S. II 1:6	XXV 0,04	S. II 1:6			
—	+	—	+	8	2	0
—	—	—	+	8	4	2
+	—	+	+	9	2	0
—	—	+	+	7	5	0
—	—	+	—	18	16	9
—	+	+	+	4	1	0
+	—	+	—	21	12	0
—	—	—	—	0	0	233
+	+	+	+	139	0	0

Zu den Resultaten (Tab. IV) ist folgendes zu bemerken: Wie zu erwarten war, ergaben sich bei beiden Extrakten bei geringeren Komplementdosen (Verwendung stärkerer Verdünnungen statt der Komplementlösung 1/10) mehr positive Reaktionen. Dabei verstärkte sich der Reaktionsausfall der WaR. bei den beiden benutzten Extrakten in verschiedenem Grade.

Tabelle IV.

Der Reaktionsausfall verstärkte sich gegenüber der Komplementdosis 1:10 in folgender Weise:

		a Lues	b unbestimmte Diagnose	c keine Lues	Bemerkungen zu Spalte: c
XXV.	E. bei Komplement 1:15	24	26	2	Placentarblut, Scabies (717) (870)
	„ „ 1:20	31	71	13	siehe Anmerkung 1
	„ „ Austitrier.	29	22	9	„ „ 2
S. II.	„ „ 1:15	19	11	2	Placentarblut (1302), Bubo inguinalis (1222)
	„ „ 1:20	29	27	6	siehe Anmerkung 3
	„ „ Austitrier.	24	11	2	Status p part. (1469) Angina lacunaris (1533)

Anm. 1) 6× Status p. part. (188, 281, 88, 89, 314, 504).
3× Placentarblut (282, 345, 283).
2× Nabelschnurblut (346, 469).
1× Gonorrhöe (548).
1× Fluor (495).
(Fett gedruckte Nrn. auch mit Extr.-S. II. positiv.

Anm. 2) 2× Gonorrhöe (1536, 1987).
1× Arthr. gon. (1986).
1× Tuberkul. (1604).
2× Retroplacentarblut (1624, 1863).
1× Stat. p. part. (1861).
1× Nabelschnurblut (1671).
1× Echinok. ?? (1677).
Anm. 3) siehe Nr. 188, 281, 282, 346, 469, 548.

Tabelle V.

Beispiel für die Austitrierung des Komplementes (Einstellung gegenüber den Extrakten XXV und S. II mit negativem Serum).

	Komplementmenge, auf 0,25 ccm aufgefüllt					
	0,25	0,2	0,15	0,1	0,075	0,05
α) 0,5 NaCl-Lösung 0,25 Ambozeptorverdünnung (1:900) 0,25 Blutkörperchen (1:20)	0	0	0	0	$+_2$	$+^3/_4$
β) 0,25 ccm Extrakt XXV (0,04) 0,25 „ negatives Serum (1:5) 0,25 „ Amboceptorverd. (1:900) 0,25 „ Blutkörperchen (1:20)	0	0	±	$+_3$	$+_3$	$+_4$
γ) 0,25 ccm Extrakt S. II (1:6) 0,25 „ negatives Serum (1:5) 0,25 „ Amboceptorverd. (1:900) 0,25 „ Blutkörperchen (1:20)	0	0	0	$+_2$	$+^3/_4$	$+_4$

Es bedeutet: 0 = komplette Hämolyse, $+_4$ = komplette Hemmung der Hämolyse, ± bis $+^3/_4$ = gibt den Grad der partiellen Hemmung an.

Bei sicher luetischen Seren ist der Unterschied schon in die Augen springend; bei dem Luesleberextrakt ist die Zahl der positiven Sera überall größer. Deutlicher hervortretend sind die Unterschiede bei den Fällen mit unbestimmter Diagnose, wo wir bei Verwendung der Komplementverdünnung 1/15 z. B. beim Extrakt XXV eine Steigerung der positiven Resultate um 5,2 Proz. hatten, gegenüber 2,2 Proz. beim Extrakt S. II, und bei 1/20 Komplement sogar um 14,2 gegen 5,4; beim austitrierten Komplement war die Steigerung 4,4 bzw. 2,2 Proz.

Während in diesen Fällen bei positivem Ausfall der Reaktion mit dem Vorliegen von Lues zu rechnen war, zeigen die Befunde bei angeblich luesfreien Personen aber, daß sich anscheinend mit der Verschärfung der Reaktion durch Verwendung geringerer Komplementdosen (stärkere Verdünnung des Komplementes) auch die Gefahr unspezifischer Reaktionen vermehrt. Wenn die Zahl der (anscheinend) falsch positiven Ergebnisse auch bei 1/15 Komplement nur gering ist, so fanden sich doch hier bei Verwendung geringerer Komplementmengen bei beiden Extrakten einzelne anscheinend unspezifische Resultate.

Das Ergebnis meiner Untersuchungen möchte ich daher dahin zusammenfassen, daß bei den mit 1/10 Komplementverdünnung eingestellten Extraktdosen das Arbeiten mit 1/15 Komplement nicht ungefährlich ist. Der positive Ausfall dieser Versuchsreihe könnte nur bei Seren von Personen mit sicher luetischen Infektionen diagnostische Bedeutung haben.

Nachdruck verboten.

Erwiderung auf die Arbeit von J. Tomioka: „Experimenteller Beitrag zur Frage der Immunität bei Recurrens und ihrer Beeinflussung durch die Salvarsantherapie" in Bd. 92. Nr. 1|2 des Centralbl. f. Bakt. etc.[1]).

Von Prof. **Buschke** und Dr. **Kroó.**

In der oben angeführten Arbeit hat Tomioka die Befunde, welche wir über experimentelle Recurrens in mehreren Arbeiten (Klin. Woch. 1922. S. 2323, 2470; 1923. S. 581; Dtsch. med. Woch. S. 1435) mitgeteilt haben, auf Anregung von Manteufel nachgeprüft und unsere Ergebnisse zum Teil bestätigt, zum Teil aber ist er zu abweichenden Resultaten gelangt. Da wir der Ansicht sind, daß die abweichenden Resultate teilweise durch eine nicht genau der unseren entsprechende Methodik, teilweise aber durch nicht ganz zutreffende Voraussetzungen und Schlüsse bedingt sind, erlauben wir uns, kritisch auf die wichtigsten Punkte der Arbeit Tomiokas nochmals einzugehen.

Was zunächst die Technik betrifft — das Allerwichtigste bei der Nachprüfung einer Arbeit — so ist Tomioka fast in den sämtlichen Punkten mehr oder weniger stark von unserer Methodik abgewichen: so hat er statt der subkutanen Einverleibung des Kontagiums die perkutane Methode Manteufels angewandt. Es ist ohne weiteres verständlich, daß bei zwei so verschiedenen Inukolationsmethoden wie der perkutanen und subkutanen die Gestaltung der Krankheit und die damit verbundenen Vorgänge der Immunität zum mindesten nicht dieselben sein müssen. Des ferneren gehen ja bei der perkutanen Methode eine

1) Die verspätete Erwiderung ist dadurch bedingt, daß Dr. Kroó sich im Auslande befand.

große Anzahl der Spirochäten zugrunde, ohne zur Resorption zu gelangen, im Gegensatz zur subkutanen. Dieser Umstand fällt besonders ins Gewicht bei den abweichenden Resultaten von Tomioka bezüglich der Superinfektionsfrage. Nachdem er nach Salvarsanbehandlung keine Spirochäten im Gehirn fand, sagt er: „Daraus geht hervor, daß durch die frühzeitige Neosalvarsanbehandlung mit allerdings starken Dosen alle Parasiten abgetötet worden waren, auch die etwa bereits ins Gehirn eingedrungenen." Das ist möglich. Woher aber weiß Tomioka, daß die Spirochäten nach 24 Std. „bereits ins Gehirn eingedrungen" sind? Wir bezweifeln das bei der perkutanen Methode, während es bei unserer subkutanen Versuchsanordnung mit Sicherheit erfolgt (demonstriert im Verein f. inn. Med. am 27. 11. 1922, und in der Dermat. Gesellschaft zu Berlin). Sagt ja selbst Tomioka, daß, während bei der intraperitonealen (und nach unserer Erfahrung auch der subkutanen) Infektion bereits nach Stunden, und jedenfalls in größerer Anzahl am nächsten Tage die Spirochäten in der Blutbahn zu finden sind, „muß man bei perkutaner Infektion oft bis zum 2. oder 3. Tage auf eine mikroskopisch feststellbare Blutinfektion warten". Auch gelingt die perkutane Infektion nicht in allen Fällen. Wie kann nun Tomioka verlangen, daß unter solchen Umständen die Spirochäten nach diesem Inokulationsverfahren schon nach 24 Std. in dem Gehirnparenchym sich finden sollen, wo sie nicht einmal in den Blutgefäßen nachzuweisen sind.

Aber nicht nur die Form der Impfung weicht wesentlich von unserer Versuchsanordnung ab, sondern auch die verabreichte Salvarsandosis entspricht nicht unseren Versuchsbedingungen und nicht unserer Fragestellung, und endlich wird das von uns angegebene Zeitintervall der Salvarsanverabreichung nicht eingehalten (wenn es bei Tomioka heißt: „erhielten .... die Mäuse die auch von Buschke und Kroó angewandte starke Heildosis 5 mg Neosalvarsan intravenös ....", so ist das ein Irrtum). Wir gaben bei Prüfung der Superinfektionsfrage nur 3 mg, wie aus unserer Arbeit ersichtlich (Klin. Woch. 1923. S. 581). Wir haben uns ja bei Prüfung dieser Frage gerade bemüht, diejenige Salvarsandosis ausfindig zu machen, bei welcher nach Möglichkeit Restparasiten im Gehirn verbleiben, der ganze übrige Organismus aber sterilisiert wird. Wir gaben bei der Prüfung der Superinfektionsfrage 0,003 Neosalvarsan, 48 Std. nach erfolgter subkutaner Infektion, wobei wir auch nur in einer kompletten Serie ein positives Resultat zu verzeichnen hatten (62 Proz. Superinfektionen), Tomioka gab dagegen 0,005 Neosalvarsan 24 Std. nach perkutaner Infektion, und als er in einer anderen Serie entsprechend unseren Angaben 0,003 Neosalv. (nach 24 Std. und bei perkutaner Methode!) anwandte, wiederholte er — abweichend von unseren Versuchen — die verabreichte Dosis nach zwei Tagen. Wir wollen ja nicht bezweifeln, daß möglicherweise durch frühzeitig angewandte große Dosen eine völlige Sterilisierung der Tiere erzielt werden kann (s. auch Kolle u. Stühmers Aussprache auf dem Münchener Dermatologenkongreß 1923), aber 1) ist hier (schon bei 0,005 Neosalv.) die Mortalität der Tiere eine sehr erhebliche, 2) kam es uns gerade darauf an, eine Versuchsanordnung zu geben, nach welcher eine Superinfektionsmöglichkeit bei einer Spirochätenkrankheit bewiesen werden kann. Und so ist Tomioka in diesem Teile seiner Arbeit von falscher Fragestellung und Voraussetzungen ausgegangen. Es ist sogar erstaunlich, daß er bei seiner

Methodik eine latente Gehirninfektion noch immer in 12,5 Proz. feststellen konnte. Nähert er sich aber in einer seiner Serien im Prinzip unserer Fragestellung (S. 55, Tab. V), so lassen sich dann von 7 „mit kleinen Neosalvarsandosen behandelten Tieren bei 3 Restparasiten im Gehirn nachweisen", jedoch weder im Blut, noch in anderen Organen. Damit ist eins unserer wichtigsten Ergebnisse bestätigt. Auch gibt er an, daß bei „Spätbehandlung" ein Verbleiben von Restparasiten nur noch im Gehirn in einem Drittel der Untersuchungen nachzuweisen ist. — Endlich hat Tomioka bei Nachprüfung der Superinfektionsfrage den Reinokulationsversuch nach Salvarsanheilung nicht ausgeführt (Tab. B unserer Arbeit Klin. Woch. 1923. S. 581). Er sagt aber in seiner Schlußfolgerung, er halte den Beweis nicht für erbracht, daß durch die Versuche von Buschke und Kroó die Möglichkeit einer Superinfektion bei einer Spirochätose bewiesen sei. Hätte er den Ergänzungsversuch angelegt, so hätte er sich vermutlich überzeugt, daß es eine Superinfektionsmöglichkeit gibt. Kudicke, Feld und Collier ist es jedenfalls gelungen [„Aus unseren Versuchen erhellt, daß eine Superinfektion . . . in der Tat mit Regelmäßigkeit zu reproduzieren ist, wenn man sich innerhalb bestimmter Versuchsbedingungen hält . . ." (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 102. 1924. H. 1/2)]. Uebrigens wurde seither diese Frage auch bei der experimentellen Kaninchensyphilis im positiven Sinne entschieden (Brown u. Pierce, Steinfeld, Frei). — Anwendung einer leichteren Inokulationsmethode (längere Inkubationsdauer), doppeltstarke Heildosen, um die Hälfte abgekürzte Krankheitsdauer, Unterlassen des Ergänzungsversuches, das sind keine indifferenten Abweichungen, und darum ist auch die Arbeit von Tomioka keine Nachprüfung unserer Ergebnisse, sie ist vielmehr eine neue Arbeit über das gleiche Thema mit in allen Punkten abweichender Versuchsanordnung.

Was endlich die Zerstörung resp. Abschwächung der Immunität nach Salvarsanbehandlung betrifft, so haben wir uns ja selbst keineswegs kategorisch ausgedrückt. Es heißt u. a. bei uns: „. . . so geht aus den Versuchen nicht mit voller Klarheit eine präzise Antwort auf die gestellte Frage . . . . . hervor." Uebrigens ist die Zerstörung resp. die Beeinflussung der Immunität nach Salvarsanbehandlung bei Syphilis durch neuere Untersuchungen von Reiter wahrscheinlich gemacht (dies. Centralbl. Bd. 92. H. 7—8). Hier heißt es: „Es scheint unter Umständen zu gelingen, durch genügend wirksame Behandlung die erworbene Immunität zu zerstören — selbst in solchen Fällen, in denen die Wiederimpfung weit jenseits der 13-Wochengrenze liegt." Endlich hat Tomioka bei diesem Versuch, entgegen unserer Versuchsanordnung, mit 3maliger Salvarsanbehandlung nur eine einmalige Dosis verabreicht.

Unsere Parasitenbefunde im Gehirn während der Immunitätsperiode bestätigt Tomioka (Parasitenbefunde nach 21 Tagen in 100 Proz., nach 36 Tagen in 20 oder 40 Proz. [nicht klar ersichtlich] nur noch im Gehirn)[1]). Daß wir in manchen Perioden mehr Befunde hatten, kann nicht zuletzt, außer in der technischen Differenz, vielleicht auch auf biologischen und Virulenz-Verschiedenheiten des Stammes beruhen.

1) Hier möchten wir den wichtigen Befund von Steiner vermerken, der bei der experimentellen Recurrens des Menschen (zwecks Beeinflussung der Paralyse vorgenommen) im Liquor cerebrospinalis bei voll ausgebildeter Immunität noch virulente Recurrensspirochäten fand.

Wir verweisen hier nur auf die Angaben von Ehrlich und Hata über die prozentualen Zahlen der Rezidive und der Mortalität. In 200 Passagen schwankten periodenweise die Zahl der Rezidive von 3—5, sogar 7; die Mortalität von 15,4 Proz. bis 46,6 Proz. (Ehrlich-Hata: Die experiment. Chemoth. der Spirillosen, S. 10). Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch andere biologische Eigenschaften ein und desselben Stammes in ähnlicher Weise schwanken können.

Nachdruck verboten.

Ueber den Bakteriengehalt des Magens und des Dünndarms vom gesunden Meerschweinchen.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich (Direktor: Prof. Dr. W. Silberschmidt).]

Von **Szaja Baumatz** aus Zawiercie (Polen).

Die Frage der Darmflora steht seit längerer Zeit im Brennpunkt des allgemeinen Interesses. Schon zu Beginn des 18. Jahrhunderts wurden im gesunden menschlichen Stuhle Mikroorganismen beobachtet, die dann von verschiedenen Autoren des näheren beschrieben wurden.

Später beschäftigte man sich mit der Frage, welche Bedeutung die im Stuhle gefundenen Bakterien für die Physiologie und Pathologie der Verdauung haben, was für eine Rolle sie für die verschiedenen Vorgänge im ganzen Darmtraktus spielen. Für das Studium der Darmbakterien kommen 4 Hauptfragen in Betracht:

1) Ist das Leben ohne Darmbakterien möglich? 2) Welche schädliche Wirkung üben sie aus? 3) Welchen Nutzen haben sie? 4) Welche Rolle spielen sie in den einzelnen Darmabschnitten?

Mit der 1. Frage beschäftigte sich vor allem Pasteur, der dieses Problem aufgerollt hat und das tierische Leben ohne die Darmbakterien für unmöglich hält. Schottelius machte Versuche in dieser Richtung, indem er junge Hühnchen steril züchtete. Er konstatierte, daß sie im Gegensatz zu den normal ernährten an Gewicht stark zurückblieben und dann endlich zugrunde gingen. Sobald er zu der sterilen Nahrung eine Aufschwemmung von Darmbakterien zusetzte, gediehen die Tiere sehr gut. Schottelius zog daraus den Schluß, daß die Anwesenheit und die Tätigkeit der Darmbakterien für die Ernährung der Wirbeltiere und Menschen notwendig sei. Die Darmbakterien sollen nach ihm die Peristaltik anregen und die in den Darm hineingelangenden pathogenen Mikroorganismen durch Ueberwucherung und Festigung des Körpers vernichten.

Frau O. Metschnikoff experimentierte an steril genährten Froschlarven und konnte auch ein Nichtgedeihen derselben im Gegensatz zu den normal genährten feststellen. Sie zieht aber daraus keine allgemeinen Schlüsse für die Notwendigkeit der Anwesenheit und der Tätigkeit der Darmbakterien im Darmtraktus.

Nuttall und Thierfelder machten ähnliche Versuche an Meerschweinchen, kamen aber zu anderen Resultaten und stellten daher eine entgegengesetzte These auf, und zwar, daß die Meerschweinchen

ohne Darmbakterien sehr gut gedeihen können. Sie sprachen sich gegen die Notwendigkeit derselben aus. Diese Frage ist bis zum heutigen Tage noch nicht endgültig entschieden.

Die 2. Frage, welchen Nutzen die Darmbakterien haben, suchte Tissier zu beantworten. Er konnte beobachten, daß die Anwesenheit von Bacillus bifidus im Säuglingsstuhle den Säugling vor Infektionen schützt. Eine schon aufgetretene Infektion konnte er durch Darreichung einer Kohlehydratnahrung, die das Wuchern des Bacillus bifidus begünstigt, bekämpfen. Die Darmbakterien sollen nach Tissier als Schutzmittel gegen die Entwicklung pathogener Keime und solcher Mikroorganismen, die schädliche Zersetzungen des Darminhaltes verursachen, dienen. E. Metschnikoff befaßte sich mit der Frage der schädlichen Wirkung der Darmbakterien, hob den schädigenden Einfluß derselben hervor und wies auf die üblen Folgen der Resorption von Fäulnisprodukten aus dem Darme hin. E. Metschnikoff sucht den Nachweis zu erbringen, daß ganze Abschnitte des Tractus intestinalis, speziell aber der ganze Dickdarm, entbehrlich seien. Diese Schlußfolgerung zieht er aus der Tatsache, daß bei vielen Säugetieren, welche einen großen Dickdarm haben, die Lebensdauer eine kurze ist, und daß andererseits viel kleinere Wirbeltiere keinen Dickdarm, aber eine lange Lebensdauer haben. Als Beweis führt er Fälle an, bei denen durch Anhäufung, auch Retention großer Kotmassen im Darm infolge von Autointoxikation oder von Autoinfektion Krankheit entsteht, und Fälle, bei denen die spontane oder künstliche Ausschaltung großer Darmstücke, ja sogar des ganzen Dickdarms, einen besseren Gesundheitszustand der betreffenden Personen zur Folge hatte.

Ueber die Rolle der Darmbakterien der einzelnen Darmabschnitte, und zwar hauptsächlich des Dünndarms, sind wir sehr wenig unterrichtet, da bisher in dieser Richtung wenig geforscht wurde, indem man sich hauptsächlich auf Untersuchungen von Fäzes beschränkt hat, so daß wir den Keimgehalt des Dickdarmes, aber nicht denjenigen des Dünndarmes kennen. Wir wissen zwar allgemein, daß der Dünndarm, im Gegensatz zum Dickdarm, eine viel geringere Keimzahl aufweist, aber diese Feststellung beruht auch zum großen Teil auf Versuchen an Leichen, deren Resultate man deshalb mit Vorsicht aufnehmen muß, weil post mortem verschiedene Umstände in Betracht gezogen werden müssen, die eine Aenderung der Flora herbeiführen.

Auf Grund all dieser Ueberlegungen hat mich Herr Professor Dr. W. Silberschmidt angeregt, den Magen und die verschiedenen Dünndarmabschnitte an gesunden Meerschweinchen, die man für Wassermann verwendet hat, sofort nach der Tötung durch Halsschnitt bakteriologisch zu untersuchen. Meine Versuche dürften gegenüber den früheren Experimenten den Vorzug haben, daß die Leichen frisch waren und von gesunden Tieren stammten, und daß ich sofort nach der Tötung mikroskopische Bilder der Darmabschnitte verschiedener Teile bekommen konnte.

Bevor ich auf den experimentellen Teil näher eingehe, möchte ich in folgendem eine kurze Zusammenstellung der Literatur der Dünndarmflora geben:

Kohlbrugge berichtete in seinem historischen Referat, daß er im Dünndarm selten Bakterien gefunden hat. Er führt diese Sterilität auf eine antibakterielle Wirkung zurück.

Dellemagne gibt eine ausführliche Beschreibung der im gesunden Darmtraktus und im Darm von Leichen vorkommenden Bakterien und kommt zu dem Schlusse, daß jeder Darmabschnitt eine spezifische Flora hat.

Landsberger fand den Dünndarm immer steril und schrieb dem Darmsaft eine bakterienvernichtende Eigenschaft zu.

Moro fand eine typische Verteilung der Darmbakterien beim Säugling. Der Dünndarm soll sehr keimarm sein, was er auf eine bakterizide Wirkung zurückführt.

Nach Tissier soll die Bakterienzahl im Duodenum sehr gering sein. Neubauer konnte nachweisen, daß die mit der Nahrung aufgenommenen Anaërobier im Magen oder Duodenum zerstört werden.

Horowitz fand, daß die Bakterienzahl gegen den Dickdarm zunimmt. Sitter untersuchte die einzelnen Darmabschnitte des Säuglings möglichst kurz nach dem Tode und fand im Duodenum Enterokokken. Coli konnte er in den oberen Teilen nicht nachweisen. Bei pathologischen Reizzuständen soll die bestehende Keimarmut des Duodenum verloren gehen.

Medowikow fand den Dünndarminhalt nur dann keimreich, wenn der betreffende Teil lokal oder allgemein geschädigt war. Unter normalen Verhältnissen und außerhalb der Verdauungsperiode soll der Dünndarm nach ihm vollständig seril sein.

Mc Neal und Chace konnten im Duodenum keine Bakterien nachweisen. Besseau-Bessert fand bei gesunden Kindern als konstanten Bewohner der oberen Darmabschnitte den Enterococcus, aber nie Coli.

Ganter und van der Reis wollen eine bakterizide Wirkung des Dünndarms festgestellt haben.

De Giaca untersuchte den Bakteriengehalt der verschiedenen Darmabschnitte bei Herbi-, Omni- und Karnivoren. Bei den Herbivoren fand er im Dünndarm mehr Bakterien als im Magen. Bei den Karnivoren enthielt der Dünndarm weniger Bakterien als der Magen.

Klein stellte an Hand von Versuchen an Kaninchen fest, daß im Dünndarm eine Anzahl Bakterien abstirbt, ohne daß vollständige Sterilität erreicht wird.

Geßner will im Duodenum verschiedene Bakterienarten konstant nachgewiesen haben.

Bogendörfer machte mittels der Schlauchmethode Untersuchungen an 15 darmgesunden Versuchspersonen, und zwar 12 Std. nach der letzten Nahrungsaufnahme. Er stellte eine konstante Dünndarmflora, die aus grampositiven Mikrokokken, aus dem der Coli-Gruppe angehörigen Bacterium acidi lactici und grampositiven, den langen Milchsäurebazillen zuzuzählenden Stäbchen besteht, fest. Bezüglich der Verteilung der Bakterien in den einzelnen Dünndarmabschnitten konstatierte er, daß im oberen Teil der Enterococcus, in 2 m Entfernung vom Pylorus, Bacterium lactis aërogenes, und in den untersten Abschnitten die grampositiven Stäbchen (Acidophilus-Gruppe und sporentragende Stäbchen) vorherrschen. Hingegen wurden unter pathologischen Verhältnissen im ganzen Dünndarm Coli und andere der Dickdarmflora eigentümliche Keime angetroffen. Auffallend war eine Parallele zwischen dem Fehlen der freien Salzsäure im Magensaft und dem Auftreten von Dickdarmkeimen im Dünndarm.

Leubuscher prüfte den Einfluß des Darmsaftes, des pankreatischen Saftes und der Galle auf Bakterien und kam zu dem Schlusse, daß im Darmsaft und im pankreatischen Saft sich Bakterien verschiedenster Art gut entwickeln können und daß nur die freien Gallensäuren die desinfizierende Wirkung ausüben.

Bogendörfer und Buchholz untersuchten den Einfluß der Ernährungsweise auf die Dünndarmflora. Es zeigte sich, daß diese von der Art der Nahrung abhängt. Im Verlaufe der Kohlehydratnahrung wurden hauptsächlich grampositive Stäbchen, bei Fleischkost Bact. lactis aërogenes und Coli gefunden. Diese Umstimmung der Flora führen die Autoren auf eine durch den Kostwechsel herbeigeführte Aenderung der H-Ionenkonzentration zurück.

Während der Fleischkost sollen im Dünndarm optimale Bedingungen für die Ansiedlung und das Gedeihen von Bacterium coli vorherrschen.

G. Janarelli hat die Wirkung der Darmsäfte auf Bakterien und Milzbrandsporen untersucht und gefunden, daß die nichtsporenbildenden Bakterien rasch abgetötet werden, sobald sie in der Magenhöhle angelangt sind. Der Darminhalt verhindert ihre Entwicklung, auch wenn sie durch den Pylorus gelangen, wegen einer deutlich bakteriziden Eigenschaft. Die Milzbrandsporen passieren den Magen; in dem Dünndarm angelangt, ist es ihnen aber nicht möglich, zu keimen, da in vivo und in vitro die Darmsäfte das Auskeimen der Milzbrandsporen verhindern. Dadurch

wäre die entwicklungshemmende Wirkung des Darmsaftes gegen Milzbrandsporen erwiesen.

Das Problem der Dünndarmflora beschäftigte auch die Chirurgen. Entgegen der bakteriologisch festgesetllten Tatsache, daß der Dünndarm eine geringere Zahl von Bakterien als der Magen und der Dickdarm aufweist, konnten sie die klinische Beobachtung machen, daß Perforationsperitonitiden vom Dünndarm eine viel schlechtere Prognose aufweisen als die vom Magen oder Dickdarm.

Conrad Brunner nahm dieses Problem in Angriff und studierte die Frage, welche Quantitäten Darminhalt aus nichterkranktem menschlichen Dünndarm notwendig sind, um bei Kaninchen tödliche Peritonitis zu erzeugen. Er verwendete dazu Dünndarminhalt, den er aus Darmfisteln gewonnen hatte. Dieser wurde unter allen Kautelen aufgefangen und in verschiedenen Mengen Kaninchen ins Abdomen gebracht. Schon geringe Mengen von Dünndarminhalt konnten tödliche Peritonitis herbeiführen, während beim Magen viel größere Quantitäten vertragen wurden. Nur bei anazidem Mageninhalt erreichte er ähnliche Resultate. Somit konnte die klinisch beobachtete Tatsache durch Brunner eine experimentelle Bestätigung finden. Auch machte Brunner dieselben Versuche mit Dünndarminhalt bei pathologischen Verhältnissen und konnte keine größere Pathogenität gegenüber dem normalen Dünndarminhalt feststellen.

Die Bakteriologie der durch Dünndarminhalt verursachten Peritonitis wurde schon früher von Silberschmidt und Bumm studiert. Silberschmidt beschäftigte sich hauptsächlich mit den Anaërobiern. Es wurden konstant Streptokokken und Coli gefunden, ferner ein zur Subtilis-Gruppe gehörender Bazillus.

Die Ursache der größeren Pathogenität des Dünndarminhaltes sucht Brunner in verschiedenen Faktoren der Disposition. Diese sind bei den verschiedenen Ursachen der Darmperforation den verschiedensten Variationen unterworfen. Bei traumatischer Darmruptur soll das Extravasat ein vorzüglicher Nährboden für die Bakterien sein. Wird das Peritoneum nicht plötzlich überfallen, so hat es Zeit, sich auf den Ueberfall vorzubereiten, die Resistenz wird erhöht, durch langsame Diffusion von Bakteriengiften kommt es zu einer Pseudoimmunität, welche bis zu einem gewissen Grade Schutz bieten soll gegen den bei erfolgter Perforation austretenden Infektionsstoff.

Jundell untersuchte den Dünndarminhalt des Menschen bei operativer Eröffnung. In einem Falle (Gastroenterostomie) wegen Carcinoma pylori fanden sich zahlreiche Bakterien. Verfasser erklärt das aus der Verjauchung des Tumors. In anderen gleichen Fällen aber ohne Tumorverjauchung, sowie in 2 Fällen von Gastroenterostomie wegen gutartiger Pylorusstenose wurden wenige Bakterien im Kulturversuch gefunden, so daß der Dünndarm von Jundell als steril angesehen wird. Die Sterilität wird auf die sterile Wirkung der Darmwandzellen zurückgeführt.

Eigene Untersuchungen.

Es wurden 25 gesunde Meerschweinchen, die für den Wassermann dienten, untersucht. Die Tiere wurden sofort nach der Tötung seziert. Es wurde das ganze Abdomen freigelegt und der Inhalt von den einzelnen Darmabschnitten (vom Magen bis zum Uebergang des Dünndarms in den Dickdarm) entnommen. Die Entnahme geschah folgendermaßen:

Zuerst wurde die Oberfläche der Darmserosa mit einem glühenden Messer sterilisiert, dann mit einer Pasteur-Pipette eingestochen und einige Tropfen Darminhalt aufgesogen. Das aspirierte Material wurde in sterilisierte Röhrchen gebracht, mikroskopisch untersucht und nachher wurden Kulturen angelegt, die entsprechend dem mikroskopischen Befund mit kleineren oder größeren Mengen überimpft wurden und für 24, 48 und, falls noch kein Wachstum erfolgt war, 72 Std. im Brutschrank gelassen.

Zuerst arbeitete ich mit gewöhnlichen Nährböden bei leicht alkalischer Reaktion, später versuchte ich durch Veränderung der H-Ionenkonzentration weitere Kulturen zu bekommen, um das Wachstum der mikroskopisch nachgewiesenen Mikroorganismen zu unterstützen.

Die Befunde seien nachstehend in tabellarischer Zusammenstellung wiedergegeben:

Tabelle I.
Magen.

Mikroskopischer Befund

20 Tiere: sehr viele Mikroorganismen
4 Tiere: viele Mikroorganismen
1 Tier : wenige Mikroorganismen

Art der Mikroorganismen

Grampositive Stäbchen

6 Tiere: sehr viele
7 Tiere: viele
12 Tiere: wenige

Gramnegative Stäbchen

17 Tiere: sehr viele
3 Tiere: viele
5 Tiere: wenige

Grampositive Diplokokken

1 Tier : sehr viele
2 Tiere: viele
12 Tiere: wenige
10 Tiere: keine

Grampositive Mikrokokken in Haufen

1 Tier : wenige
24 Tiere: keine

Grampositive Kokken

2 Tiere: wenige
23 Tiere: keine

Soor, resp. Hefeformen

2 Tiere: sehr viele
1 Tier : viele
11 Tiere: wenige
11 Tiere: keine

Kultureller Befund

16 Tiere: sehr starkes Wachstum
4 Tiere: starkes Wachstum
5 Tiere: geringes „

Art der Mikroorganismen

Subtilis

11 Tiere: sehr viele Kolonien
5 Tiere: viele Kolonien
6 Tiere: wenige „
3 Tiere: keine „

Coli

4 Tiere: sehr viele Kolonien
2 Tiere: viele Kolonien
1 Tier : wenige „
18 Tiere: keine „

Grampositive Diplokokken

2 Tiere: viele Kolonien
1 Tier : wenige „
22 Tiere: keine „

Grampositive Streptokokken

2 Tier : sehr viele Kolonien
23 Tiere: keine Kolonien

Gramnegative Streptokokken

1 Tier : wenige Kolonien
24 Tiere: keine „

Soor, resp Hefeformen

3 Tiere: sehr viele Kolonien
22 Tiere: keine Kolonien

Grampositive Fäden

2 Tiere: sehr viele Kolonien
22 Tiere: keine Kolonien

Grampositive Mikrokokken in Haufen

1 Tier : viele Kolonien
1 Tier : wenige „
23 Tiere: keine „

Tabelle II.
Duodenum

Mikroskopischer Befund

2 Tiere: vereinzelte Mikroorganismen
23 Tiere: keine Mikroorganismen

Art der Mikroorganismen

Grampositive St chen

2 Tiere: wenige
23 Tiere: keine

Gramnegative Stäbchen

1 Tier : wenige
24 Tiere: keine

Kultureller Befund

5 Tiere: sehr starkes Wachstum
4 Tiere: starkes Wachstum
9 Tiere: geringes „
7 Tiere: kein „

Art der Mikroorganismen

Subtilis

2 Tiere: sehr viele Kolonien
2 Tiere: viele Kolonien
7 Tiere: wenige „
14 Tiere: keine „

Grampositive Diplokokken
25 Tiere: keine

Grampositive Mikrokokken in Haufen
25 Tiere: keine

Gramnegative Diplokokken
1 Tier : wenige
24 Tiere: keine

Soor, resp. Hefeformen
1 Tier : wenige
24 Tiere: keine

Coli
2 Tiere: sehr viele Kolonien
1 Tier : viele Kolonien
1 Tier : wenige „
21 Tiere: keine „

Grampositive Streptokokken
1 Tier : sehr viele Kolonien
1 Tier : viele Kolonien
3 Tiere: wenige „
20 Tiere: keine „

Grampositive Mikrokokken in Haufen
2 Tiere: sehr viele Kolonien
3 Tiere: viele Kolonien
9 Tiere: wenige „
11 Tiere: keine „

Soor, resp. Hefeformen
1 Tier : viele Kolonien
24 Tiere: keine „

Grampositive, lange Fäden
1 Tier : wenige Kolonien
24 Tiere: keine „

Tabelle III.
Jejunum.

Mikroskopischer Befund
1 Tier : sehr viele Mikroorganismen
3 Tiere: viele Mikroorganismen
14 Tiere: wenige Mikroorganismen
7 Tiere: keine Mikroorganismen

Art der Mikroorganismen

Grampositive Stäbchen
2 Tiere: viele
8 Tiere: wenige
15 Tiere: keine

Gramnegative Stäbchen
2 Tiere: viele
6 Tiere: wenige
17 Tiere: keine

Grampositive Diplokokken
1 Tier : sehr viel
1 Tier : viele
10 Tiere: wenige
13 Tiere: keine

Grampositive Streptokokken
1 Tier : wenige
24 Tiere: keine

Gramnegative Diplokokken
3 Tiere: viele
3 Tiere: wenige
19 Tiere: keine

Kultureller Befund
9 Tiere: sehr starkes Wachstum
2 Tiere: starkes Wachstum
7 Tiere: geringes Wachstum
7 Tiere: kein Wachstum

Art der Mikroorganismen

Subtilis
6 Tiere: sehr viele Kolonien
1 Tier : viele Kolonien
9 Tiere: wenige Kolonien
9 Tiere: keine Kolonien

Coli
5 Tiere: sehr viele Kolonien
1 Tier : wenige Kolonien
19 Tiere: keine Kolonien

Grampositive Diplokokken
2 Tiere: sehr viele Kolonien
1 Tier : viele Kolonien
22 Tiere: keine Kolonien

Grampositive Mikrokokken in Haufen
2 Tiere: sehr viele Kolonien
1 Tier : viele Kolonien
2 Tiere: wenige Kolonien
20 Tiere: keine Kolonien

Soor resp. Hefeformen
2 Tiere: viele Kolonien
23 Tiere: keine Kolonien

Aktinomyzeten
2 Tiere: wenige Kolonien
23 Tiere: keine Kolonien

Tabelle IV.

Ileum.

Mikroskopischer Befund

3 Tiere: sehr viele Mikroorganismen
5 Tiere: viele Mikroorganismen
15 Tiere: wenige Mikroorganismen
2 Tiere: keine Mikroorganismen

Art der Mikroorganismen

Grampositive Stäbchen

1 Tier : sehr viele
5 Tiere: viele
11 Tiere: wenige
8 Tiere: keine

Gramnegative Stäbchen

2 Tiere: sehr viele
1 Tier : viele
4 Tiere: wenige
18 Tiere: keine

Grampositive Diplokokken

5 Tiere: viele
9 Tiere: wenige
11 Tiere: keine

Grampositive Streptokokken

1 Tier : viele
3 Tiere: wenige
21 Tiere: keine

Soor

23 Tiere: sehr viele
1 Tier : viele
1 Tier : wenige

Gramnegative Diplokokken

1 Tier : sehr viele
1 Tier : viele
2 Tiere: wenige
21 Tiere: keine

Kultureller Befund

15 Tiere: sehr starkes Wachstum
3 Tiere: starkes Wachstum
5 Tiere: geringes Wachstum
2 Tiere: kein Wachstum

Art der Mikroorganismen

Subtilis

9 Tiere: sehr viele Kolonien
3 Tiere: viele Kolonien
6 Tiere: wenige Kolonien
7 Tiere: keine Kolonien

Coli

7 Tiere: sehr viele Kolonien
3 Tiere: viele Kolonien
2 Tiere: wenige Kolonien
13 Tiere: keine Kolonien

Grampositive Diplokokken

1 Tier : sehr viele Kolonien
2 Tiere: viele Kolonien
4 Tiere: wenige Kolonien
18 Tiere: keine Kolonien

Grampositive Mikrokokken in Haufen

4 Tiere: sehr viele Kolonien
2 Tiere: viele Kolonien
3 Tiere: wenige Kolonien
16 Tiere: keine Kolonien

Grampositive Streptokokken

2 Tiere: sehr viele Kolonien
1 Tier : viele Kolonien
1 Tier : wenige Kolonien
21 Tiere: keine Kolonien

Aktinomyzeten

1 Tier : sehr viele Kolonien
2 Tiere: wenige Kolonien
22 Tiere: keine Kolonien

Tabelle V.

Endteil des Dünndarms (oberhalb der Valvula Bauhini).

Mikroskopischer Befund

2 Tiere: sehr viele Mikroorganismen
6 Tiere: viele Mikroorganismen
12 Tiere: wenige Mikroorganismen
5 Tiere: keine Mikroorganismen

Art der Mikroorganismen

Grampositive Stäbchen

1 Tier : sehr viele
4 Tiere: viele
8 Tiere: wenige
12 Tiere: keine

Kultureller Befund

14 Tiere: sehr starkes Wachstum
5 Tiere: geringes Wachstum
6 Tiere: kein Wachstum

Art der Mikroorganismen

Subtilis

9 Tiere: sehr viele Kolonien
10 Tiere: wenige Kolonien
6 Tiere: keine Kolonien

Gramnegative Stäbchen
1 Tier : sehr viele
3 Tiere : viele
5 Tiere : wenige
17 Tiere : keine

Grampositive Diplokokken
1 Tier : sehr viele
5 Tiere : viele
6 Tiere : wenige
13 Tiere : keine

Grampositive Streptokokken
1 Tier : wenige
24 Tiere : keine

Gramnegative Diplokokken
1 Tier : sehr viele
1 Tier : viele
2 Tiere : wenige
21 Tiere : keine

Soor resp. Hefeform
1 Tier : sehr viele
24 Tiere : keine

Coli
7 Tiere : sehr viele Kolonien
2 Tiere : wenige Kolonien
16 Tiere : keine Kolonien

Grampositive Diplokokken
2 Tiere : sehr viele Kolonien
2 Tiere : wenige Kolonien
21 Tiere : keine Kolonien

Grampositive Mikrokokken in Haufen
3 Tiere : sehr viele Kolonien
2 Tiere : wenige Kolonien
20 Tiere : keine Kolonien

Grampositive Streptokokken
2 Tiere : sehr viele Kolonien
1 Tier : wenige Kolonien
22 Tiere : keine Kolonien

Aktinomyzeten
1 Tier : sehr viele Kolonien
1 Tier : wenige Kolonien
23 Tiere : keine Kolonien

Soor resp. Hefeformen
1 Tier : wenige Kolonien
24 Tiere : keine Kolonien

Die Befunde der 25 untersuchten Tiere ergaben, daß der Magen eine sehr reiche Flora aufweist, während im Dünndarm eine vollständige Sterilität oder Keimarmut zu finden war. Diese Sterilität erwies sich ganz besonders im Duodenum.

Gestützt auf diese Resultate, suchte ich im weiteren der Ursache dieser Keimarmut resp. Sterilität experimentell auf den Grund zu gehen. Es wurden folgende Eventualitäten erörtert:

1) Die Aenderung der H-Ionenkonzentration könnte für das Verschwinden der Bakterien im Dünndarm verantwortlich gemacht werden. — 2) Der Dünndarm könnte eine bakterizide Wirkung ausüben. — 3) Gewisse Fermente könnten eine Rolle spielen. — 4) Es könnte sich um eine bakteriophage Wirkung im Sinne des d'Herelleschen Phänomens handeln.

Bis jetzt glaubten die meisten Autoren, wie auch aus der oben zusammengestellten Literatur ersichtlich ist, an eine bakterizide Wirkung. Mit den Beziehungen zwischen Darmbakterien und H-Ionenkonzentration beschäftigte sich Scheer. Er konnte nachweisen, daß die einzelnen Darmbakterien durch eine bestimmte, für sie charakteristische H-Ionenkonzentration in einer bestimmten Zeit abgetötet werden und daß die einzelnen Bakterien, welche die Fähigkeit haben, Säure zu bilden, das nur bis zu einer bestimmten, für sie charakteristischen H-Ionengrenze tun können. Da aber die einzelnen Werte bei verschiedenen Darmbakterien sowohl bei der Abtötung als auch bei der Säurebildung verschieden sind, lassen sich die einen Arten von den anderen beeinflussen. So haben z. B. Enterokokken einen Säurewert, der auf Coli abtötend wirkt, so daß auf enterokokkenhaltigen Nährböden Coli abstirbt.

Das Problem der Bakteriophagie im Darm war in neuester Zeit Forschungsgebiet von Borchard. Er untersuchte die verschiedenen

Sekrete und Inhalte des Verdünnungstraktus auf Bakteriolysat bildende Fähigkeit und bekam folgende Resultate:

Magensaft von Fistelhunden lieferte sowohl bei saurer als auch bei alkalischer Reaktion keine Lysate.

Duodenalinhalt von Fistelhunden zeigte stark wirksame Lysate gegenüber Dysenterie Y, Flexner, Shiga, Coli, Paratyphus B und Typhus.

Der Darminhalt aus den mittleren Partien von Fistelhunden zeigte ebenfalls lytische Wirkung gegen Typhus, Ruhr, Fleischvergifter, aber die Wirkung war viel schwächer als die des Duodenum.

Mit Darminhalt aus dem unteren Dünndarm von Fistelhunden verringerte sich die bakteriolytische Wirkung immer mehr. Es wurde nur noch ein schwach wirksames Lysat gegen Shiga nach 24 Std. erzeugt.

Borchard kommt zu dem Schlusse, daß es sich beim d'Herelleschen Phänomen im Verdauungstraktus primär um die Wirkung des durch die Enterokinase der Darmschleimhaut aktivierten Trypsins handelt.

Im Anschluß an meine früheren Versuche prüfte ich den Dünndarm von gesunden Meerschweinchen auf bakterizide und später auf bakteriophage Eigenschaft.

Im weiteren seien die Experimente wiedergegeben:

Versuche über die bakterizide Eigenschaft des Dünndarminhaltes von gesunden Meerschweinchen.

Technik.

Es wurden 3 Bouillon- und 3 Agarkulturen mit steril entnommenem Dünndarminhalt beschickt und 72 Std. im Brutschrank gelassen. Falls dann kein Wachstum erfolgt war, wurden Aufschwemmungen von 24 Std. alten Shiga- und Flexner-Kulturen hergestellt (in 1 ccm NaCl-Lösung $^1/_{10}$ Oese der Kultur), mit denen die 6 Röhrchen überimpft wurden.

In ein Bouillon- und ein Agarröhrchen wurden je 2 Oesen der Shiga-Aufschwemmung, in ein Bouillon- und ein Agarröhrchen je 2 Oesen der Flexner-Aufschwemmung gebracht. Die letzten zwei Röhrchen dienten zur Kontrolle. Die 6 Kulturen wurden bis 72 Std. im Brutschrank gelassen, und dann stellte ich fest, ob eine Wachstumshemmung von Shiga resp. Flexner durch den Dünndarminhalt eingetreten ist. Die Versuche wurden mit Duodenal-, Jejunal- und Ilealinhalt von 5 Tieren ausgeführt. Resultat: Nirgends war Wachstumshemmung eingetreten.

An weiteren 5 Tieren wurden dieselben Versuche mit Typhus und Coli gemacht. Resultat: Ebenfalls nirgends Wachstumshemmung.

Versuche über die bakteriophage Eigenschaft des Dünndarminhaltes von gesunden Meerschweinchen.

Technik.

Eine auf $P_H = 7{,}6$ eingestellte Bouillonkultur wurde mit 10 Oesen Dünndarminhalt überimpft und 24 Std. im Brutschrank gelassen. Nachher filtrierte ich diese Bouillonkultur mit dem Berkefeld-Filter.

Es wurden dann Agarplatten ($P_H = 7{,}6$) gegossen und abgekühlt. Letztere überimpfte ich je mit Coli, Typhus, Shiga und Flexner und ließ sie 1 Std. im Brutschrank. Nachher brachte ich in jede Platte einen Tropfen von Bouillonfiltrat. Die Platten blieben bis 72 Std. im Brutschrank, und nach 24, 48 und 72 Std. stellte ich fest, ob Bakteriophagie eingetreten ist. Die Versuche wurden an 10 Tieren mit Duodenal-, Jejunal- und Ilealinhalt ausgeführt.

Resultat: Nirgends konnte ich eine bakteriophage Wirkung nachweisen.

Zusammenfassung.

In vorliegender Arbeit wurde Magen- und Dünndarminhalt von 25 gesunden Meerschweinchen, die zur Blutgewinnung dienten, sofort nach der Tötung mikroskopisch und kulturell untersucht. Im Mageninhalt wurden regelmäßig Mikroorganismen gefunden. Kolonien von Subtilis waren in 22 Fällen, Bacterium coli bei 7 Tieren, nur ausnahmsweise andere Mikroorganismen (Mikrokokken, Streptokokken, grampositive Fäden, Soor usw.).

Im Gegensatz zu diesen Befunden erwies sich das Duodenum viel keimärmer; nur bei 2 Tieren wurden mikroskopisch einige grampositive Stäbchen und Kokken gefunden. Kulturell war 7mal der Befund negativ. Von den gefundenen Mikroorganismen wurden in 11 Fällen Subtilis, 5mal Streptokokken, und 14mal Mikrokokken in Haufen gefunden. Der Befund von Bacterium coli war nur 4mal positiv, und nur bei 2 Tieren sind sehr viele Kolonien gewachsen.

Im Jejunum wurden im allgemeinen auch wenige Mikroorganismen gefunden, wenn auch etwas häufiger als im Duodenum. 7mal blieben die Kulturen steril, 7mal war nur ein spärliches Wachstum, während in 9 Fällen ein starkes bzw. ein sehr starkes Wachstum notiert wurde. Am häufigsten wurden wiederum Subtilis-Arten gefunden (16mal), 6 Tiere hatten Bact. coli, und 3—5mal wurden Mikrokokken und Diplokokken nachgewiesen.

Aehnlich sind die Befunde bei der Untersuchung des Ileums ausgefallen. Hier wurden wieder Subtilis am häufigsten nachgewiesen, die Zahl der positiven Coli-Befunde nahm zu (12 von 25), Mikrokokken und Streptokokken hingegen nicht. Im Endteil des Dünndarmes, d. h. oberhalb der Valvula Bauhini, war in 5—6 Fällen der mikroskopische und der kulturelle Befund negativ. Subtilis und Coli verhielten sich ungefähr wie im Ileum.

Unsere Befunde lassen sich wie folgt zusammenfassen. Im Magen sind regelmäßig Mikroorganismen vorhanden. Das Duodenum und der obere Teil des Dünndarmes sind hingegen häufig keimfrei oder enthalten nur wenige Mikroorganismen. Von den gefundenen Bakterien sind Subtilis am häufigsten, Bact. coli, Streptokokken und Mikrokokken etwas seltener. Bis zum untersten Teil des Dünndarmes ist der Coli-

Befund ein seltener, aber auch anaëorbe Bakterien kommen in der Regel nicht vor.

Einige Untersuchungen wurden ausgeführt, um den Grund der Keimarmut des Dünndarmes festzustellen. Zu diesem Zwecke wurde die Bakterizidie des Dünndarminhaltes und der Gehalt an Bakteriophagen geprüft. Nach beiden Richtungen verliefen unsere Untersuchungen negativ. Es ist uns nicht gelungen, eine bakterizide Wirkung in vitro in den einzelnen Dünndarmabschnitten nachzuweisen. Die Untersuchung auf Bakteriophagen wurde mit 2 Dysenterie-Stämmen (Shiga und Flexner), Coli und Typhus, ausgeführt. In keinem einzigen Falle konnten wir Bakteriophagen gegen diese Mikroorganismen nachweisen.

Die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse bestätigen die Keimarmut des Duodenum und des Dünndarmes bei gesunden Meerschweinchen. Beim Menschen dürften, soweit uns Angaben zur Verfügung stehen, die Verhältnisse ähnlich liegen.

Die vorliegenden Untersuchungen bezwecken einen Beitrag zur Lösung des so wichtigen und noch unaufgeklärten Themas der Darmflora.

Literaturverzeichnis.

1) Pasteur, Compt. Rend. T. 100. 1885. p. 66. — 2) Schottelius, Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. (Arch. f. Hyg. Bd. 34. 1899. S. 210; Bd. 42. 1902. S. 48; Bd. 67. 1908. S. 177.) — 3) Metschnikoff, O., (Ann. Instit. Pasteur. T. 15. p. 631.) — 4) Nuttal u. Thierfelder, Ztschr. r. physiol. Chem. Bd. 21 u. 22. — 5) Tissier, Henry, Etude d'une variété d'infection intestinale. (Ann. Inst. Pasteur. T. 19. 1905. p. 109 u. 273.) — 6) Metschnikoff, E., Essais optimistes. Paris 1907. — 7) Kohlbrugge, Der Darm und seine Bakterien, kritisches Referat. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 30. S. 10—26.) — 8) Dellemagne, J., Microbes du tube gastro-intestinal des cadavres. Revue critique. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 18. S. 503.) — 9) Landsberger, Moritz, Ueber den Bakteriengehalt des Darmkanals und behauptete Bakterizidie des Darmsaftes. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 36. S. 519.) — 10) Moro, Morphologische und biologische Untersuchungen über die Darmbakterien des Säuglings. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 37. S. 736.) — 11) Tissier, Henri, Répartition des microbes dans l'intestin du nourisson. (Ref. ibid. Bd. 38. S. 18.) — 12) Neubauer, Josef, Ueber anaërobe Bakterien im Kinderdarm. (Ref. ibid. Bd. 39. S. 573.) — 13) Horowitz, Ueber die Bakterien des Verdauungstraktus beim Hunde. (Ref. ibid. Bd. 12. S. 608.) — 14) Sitter, Beiträge zur Bakteriologie des Säuglingsdarmes. (Ref. ibid. Bd. 47. S. 14.) — 15) Medowikow, Zur Frage der Verminderung der bakteriziden Kraft des Dünndarms unter Einwirkung einiger innerer und äußerer Ergänzungen. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 49.) — 16) Ders., Zur Frage der Bedeutung der Bakterien im Intestinaltraktus. Infektion und Sterilität desselben. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 50. S. 301.) — 17) Mc Neal and Chace, Contribution to the bacteriology of the Anadeum. (Ref. ibid. Bd. 59. S. 584.) — 18) Besseau-Bessert, Zur Pathogenese der akuten Ernährungsstörungen. (Jahrb. f. Kinderheilkunde. Bd. 89. S. 213.) — 19) Ganter u. van der Reis, Die bakterizide Kraft des Dünndarms. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 73. S. 370.) — 20) De Giaca, De la quantité des bactéries dans le contenu du tube gastro-entérique de quelques animaux. (Ref. ibid. Bd. 6. S. 168.) — 21) Klein, Alex, Die physiologische Bakteriologie des Darmkanals. (Ref. ibid. Abt. I. Bd. 33. S. 216.) — 22) Gesner, Ueber die Bakterien im Duodenum des Menschen. (Ref. ibid. Bd. 6.) — 23) Bogendörfer, Ueber die Flora des menschlichen Dünndarms. (Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 140. S. 257/270.) — 24) Leubuscher,

Einfluß von Verdauungssekreten auf Bakterien. (Ref. ibid. Bd. 9. S. 244.) — 25) Bogendörfer u. Buchholz, Der Einfluß der Ernährungsweise auf die Zusammensetzung des Dünndarmsaftes. (Münch. med. Woch. 1923. S. 774/775.) — 26) Janarelli, Presse méd. 1924. p. 897. (G. Janarelli, Acad. d. Scienc. 3 nov.) — 27) Brunner, Klinisches und Experimentelles über Verschiedenheiten der Pathogenität des Darminhaltes gegenüber dem Peritoneum. (Arch. f. klin. Chir. Bd. 73. 1904.) — 28) Silberschmidt, Experimentelle Untersuchungen über die bei der Entstehung der Perforationsperitonitis wirksamen Faktoren. (Mitteil. aus klin. u. med. Instit. d. Schweiz. 1893.) — 29) Jundell, Ueber das Vorkommen von Mikroorganismen im Dünndarm des Menschen. (Arch. f. klin. Chir. Bd. 83. 1904. S. 965.) — 30) Scheer, Ueber die Beziehungen der Darmbakterien zur H-Ionenkonzentration. (Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 33. 1921. S. 36.) —31) Borchard, Biologische Beiträge zum d'Herelleschen Phänomen. (Ibid. Bd. 37.)

Nachdruck verboten.

Ueber das Vorkommen von Pneumokokken in der Mundhöhle.

[Aus dem Untersuchungsamt für ansteckende Krankheiten beim Hygienischen Institut der Universität Kiel (Leiter: Prof. Dr. L. Bitter).]

Von Dr. **M. Gundel.**

Im Rahmen der Untersuchungen über Milchsäurestreptokokken und Pneumokokken von Bitter und Buchholz (1) habe ich die Untersuchungen über die Pathogenität der isolierten Keime durchgeführt. Es hatte sich hierbei gezeigt, daß in einer Serie von 37 Halsabstrichen kein Pneumokokkus gefunden wurde, sondern nur echte Milchsäurestreptokokken (auf die Differenzierung wird weiter unten eingegangen). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu der bisher Allgemeingültigkeit besitzenden Ansicht der Kliniker von dem Vorhandensein von Pneumokokken in fast jeder Mund- und Rachenhöhle. Auch Neufeld (2) sagt in jüngster Zeit, daß die Pneumokokken normale Bewohner jedes Rachens seien.

Heim (3) und Bitter und Buchholz haben nun das Verdienst, ein leichtes Differenzierungsmittel in Form der Lackmusmilch bzw. der 1proz. Milchzuckerbouillon uns an die Hand gegeben zu haben, wodurch wir in der Lage sind, zu sagen, ob es sich in dem betreffenden Fall um einen Pneumokokkus oder Milchsäurestreptokokkus handelt. Es kam mir nun bei diesen Untersuchungen darauf an, zu zeigen, daß an Hand eines größeren Materials sich die oben kurz besprochenen Ergebnisse besonders von dem Fehlen bzw. seltenen Auftretens echter Pneumokokken in der Mundhöhle bestätigen lassen. In dieser Mitteilung möchte ich mich nur mit diesen Untersuchungen beschäftigen, in einer späteren mit stoffwechselphysiologischen an Kokken im allgemeinen unter besonderer Berücksichtigung der Milchsäurestreptokokken und Pneumokokken.

Es sind 122 Rachenabstriche untersucht worden. Die Technik war die, daß direkt Aussaaten auf Ziegenblut- und Chinablauagar gemacht wurden. Nach 24 Std. wurde eine Reinkultur der streptokokkenartigen auf den gleichen Nährböden angelegt; nach 24stünd. Bebrütung wurde von den Reinkulturen überimpft in 1proz. Milchzuckerbouillon sowie

eine weiße Maus intraperitoneal mit 3 Oesen von der Original-Blutagarplatte in 0,5 ccm NaCl-Lösung gespritzt. Die Stämme wurden dann von Blutagar auf Blutagar und von Milchzuckerbouillon in Milchzuckerbouillon weiter gezüchtet. In den meisten Fällen wurde darauf nach einigen Passagen eine zweite Maus zur Bestätigung des ersten Ergebnisses gespritzt.

In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Tierversuche zusammengefaßt. Es ist aus der Aufstellung ersichtlich, daß von 95 Abstrichen

Tabelle I.

Herkunft	Zahl der apathogenen Stämme	Zahl der pathogenen Stämme	Zahl der Stämme mit wechselnder Pathog.
Gezüchtet aus der normalen Mundhöhle	85	5	5
Von Aerzten eingesandte Rachenabstriche	14	7	1

von normalen Menschen in 89,5 Proz. apathogene Keime und in 10,5 Proz. pathogene Keime (wenn die mit wechselnder Pathogenität hinzugerechnet werden dürfen) gefunden wurden. Bei 37 bei früherer Gelegenheit (1) untersuchten Rachenabstrichen wurde kein Pneumokokkus gefunden. Unsere relativ hohen Zahlen sind darauf zurückzuführen, daß einige Personen Pneumokokken in der Mundhöhle hatten, die in der Umgebung von Pneumoniekranken gelebt hatten. Das Verhältnis von apathogenen zu pathogenen ändert sich bei den Rachenabstrichen, die von Aerzten zur Untersuchung auf Diphtheriebakterien oder Eitererreger eingesandt wurden, derart, daß in 31,8 Proz. pathogene und in 63,6 Proz. der Fälle apathogene Mikroorganismen gezüchtet wurden. Nach Abschluß dieser Untersuchungen sind weitere 24 Rachenabstriche und Tonsillarabstriche untersucht worden, die das gleiche Verhältnis aufwiesen. Es ist bei dieser Gelegenheit notwendig, festzulegen, daß wir glauben, daß uns auf der Platte kaum eine pathogene Kolonie unter der Vielheit der grünen Kokken, die sich als apathogen herausstellten, entgangen ist. Da es uns darauf ankam, ein möglichst großes Material zu untersuchen, mußte ich Abstand nehmen von der Erfüllung der Forderung Yamagutis (4) „nach Ausspatelung des Mundhöhlenschleims auf einer Reihe von Blutplatten eine möglichst große Anzahl der einzelnen Kolonien getrennt weiterzuführen und für sich zu untersuchen.“ Des weiteren führte mich ein anderer Grund zur Ablehnung. Meines Erachtens ist die Wahrscheinlichkeit außerordentlich gering, bei Ueberwiegen von apathogenen Keimen einige wenige pathogene rechtzeitig, d. h. vor dem zweiten Ueberimpfen zu erkennen. Das mikroskopische Bild ist nicht verwertbar und der originale Pneumokokkus kann sich bei der zweiten Passage beträchtlich verändern. Wir haben bei unserem großen Material von über 300 Rachenabstrichen, die wir in $^1/_4$ der Fälle durch die zugehörigen Sputa ergänzen konnten, ganz eindeutige Ergebnisse erzielt (von diesen 300 Rachenabstrichen sind nur 122 — s. o. — für diese Untersuchungen eingehender bearbeitet worden). Zur Bestätigung unserer Ansicht gegenüber Yamaguti wurde folgender Versuch angestellt: Mit dem Stamm E 3444 und einem Stamm aus meinem Sputum, der sich als apathogen erwies, wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Maus I: gespritzt am 12. 10. 24 mit 0,5 ccm einer Plattenabschwemmung Stamm E 3444 intraperitonal.

Tot nach 15 Std.: Reinkulturen aus allen Organen und Herzblut. Der Stamm erwies sich auch weiterhin als hochpathogen.

Maus II: gespritzt intraperitoneal am 12. 10. mit 0,5 ccm Plattenabschwemmung Stamm Gundel. Lebt.

Maus III: gespritzt intraperitoneal am 12. 10. mit 0,1 ccm Plattenabschwemmung Stamm E 3444 und 0,4 ccm Stamm Gundel. Nach 15 Std. schwer krank, tot nach 20 Std. Aus allen Organen Reinkultur von pathogenen Lanzettekokken, die sich auch späterhin an drei weißen Mäusen als hochpathogen erwiesen.

Maus IV: gespritzt intraperitoneal mit 0,5 ccm Plattenabschwemmung Stamm Gundel.

Gesund, getötet nach 20 Std., Kontrollmaus lebt. Aussaaten steril:

Dieses Resultat wurde bei 5 von 6 weiteren Versuchen bestätigt. In einem Falle fanden sich spärlich grüne Kokken im Herzblut der getöteten Maus (die Kontrollmaus blieb am Leben).

Dieser Vorversuch veranlaßte mich, bei allen unseren Untersuchungen nicht, wie Yamaguti, Reihenaussaaten anzulegen, sondern von einer Abschwemmung auszugehen. Dieses Verfahren, eine Abschwemmung von sämtlichen gewachsenen Kolonien einzuspritzen, kommt meines Erachtens der Einverleibung von Sputum gleich und scheint mir sicherer zu sein als die Erfüllung der Forderung Yamagutis. In sämtlichen 12 Fällen der Tabelle I fanden sich die pathogenen Kokken in Reinkultur, bestätigt durch das eindeutige Ergebnis der Milchzuckerbouillon; in einer ganzen Reihe anderer Tierversuche (etwa 60) mit pathogenen Stämmen zeigte sich dasselbe Bild. Ich glaube aus diesem Grunde nicht, daß uns pathogene Keime entgangen sind.

Wie Yamaguti mit Recht betont, ist es auch dem Kenner nicht möglich, „in der Fülle der grün wachsenden Kolonien der Blutplatte einen saprophytischen und parasitischen Keim, einen sogenannten „grünen" Streptokokkus und einen Pneumokokkus zu unterscheiden". Wir haben immer wieder versucht, mit Hilfe des mikroskopischen Bildes sowie der Gallelöslichkeit zum Ziel zu kommen. Die Gallelöslichkeit versagte in manchen Fällen oder gab fragliche Werte, das mikroskopische Bild bestätigte nur selten den Tierversuch. Bitter und Buchholz haben nun nachgewiesen, daß wir die Milchsäurestreptokokken in folgende 3 (4) Typen einteilen können:

Typ I: Ziegenblutagar (1:10): große, weiße, kuppelförmige, saftige, staphylokokkenartige Kolonien mit schwärzlicher Verfärbung des Nährbodens in nächster Umgebung der Kolonie. Chinablauagar: kleine, saftige, hellblaue Kolonien.

Dieser Typ ist u. E. sehr leicht von den pathogenen Streptokokken (pyogenes, lanceolatus, mucosus) auf der Blutplatte zu unterscheiden.

Typ II: Ziegenblutagar: mehr oder minder weiße, saftige, flache Kolonien mit starker Vergrünung und Aufhellung.

Typ IIa: Chinablauagar: kleine, ziemlich spitze, tiefblaue Kolonien.

Typ IIb: Chinablauagar: kuppelförmige, tropfenartige, tiefblaue Kolonien.

Typ III: Ziegenblutagar: große, runde, tröpfenartige Kolonien mit ausgesprochener Vergrünung und Aufhellung des Nährbodens. Chinablauagar: große, runde, schleimige, tiefblaue Kolonien.

Bei Typ IIa und IIb sowie III ist eine Abtrennung der Milchsäurestreptokokken auf der Blutplatte von den pathogenen wohl nicht möglich, dagegen auf der Chinablauagarplatte bei Typ IIb und III. Typ IIa, der bei weitem am häufigsten auftretende, läßt auf beiden Nährböden eine Differenzierung zwischen Streptococcus lanceolatus oder pleomorphus auf der einen und Milchsäurestreptokokken auf der anderen Seite nicht ermöglichen. Das überwiegende Vorkommen gerade dieses Typs geht aus der Tabelle II hervor:

Tabelle II.

Herkunft	Typ I	Typ IIa	Typ IIb	Typ III
Normale Mundhöhle: apathogen!	1	71	10	1
Von Aerzten eingesandt: apathogen!	3	5	6	.
Normale Mundhöhle: pathogen!	.	5	.	.
Von Aerzten eingesandt: pathogen!	.	7	.	.

An dieser Stelle erscheint es mir als wichtig, ganz kurz auf das Hämolysierungsvermögen der Milchsäurestreptokokken zu sprechen zu kommen. Eine ausgesprochene Hämolyse habe ich niemals gesehen, dagegen eine schwache Hämolyse in den meisten Fällen (Bitter und Buchholz bezeichnen sie als Aufhellung). Das Bild ist das folgende (siehe Tabelle III): es geht aus der Aufstellung hervor, daß ein ausschließlich vergrünendes Wachstum relativ selten ist, während am häufigsten das Wachstum mit schwacher Hämolyse, gleichgültig ob bereits bei der 1. oder erst nach mehreren Passagen, beobachtet wurde. Bei dieser Gelegenheit dürfen zwei Fälle Erwähnung finden, die sicher

Tabelle III.

Herkunft	Typ	Anzahl des Typs	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Apathogene Stämme aus normaler Mundhöhle	IIa	71	13	28	30
	IIb	11	4	5	2
	III	1	1	.	.
Apathogene Stämme von Aerzten eingesandt	IIa	5	3	1	1
	IIb	6	6	.	.
Pathogene Stämme aus normaler Mundhöhle	IIa	5	2	1	2
Pathogene Stämme von Aerzten eingesandt	IIa	7	5	2	.

Anmerkung zur Tabelle III:
Gruppe 1: Wachstum nur mit Vergrünung.
„ 2: „ mit Hämolyse von der 1. Aussaat ab.
„ 3: „ „ „ nach einigen Passagen.

bei der ersten Aussaat dem Typ I angehörend, nach der 4. bzw. 6. Aussaat in den Typ IIa übergingen (Fall R. 20 und Fall E 3662 III).

Im Anschluß an diese Ausführungen seien kurz einige weitere Beobachtungen mitgeteilt: Bei dem Fall R 35 wurden hämolysierende Streptokokken mit Vergrünung eingespritzt; aus der Maus züchtete ich vergrünende Kolonien, denen die Hämolyse vollständig fehlte, sie trat erst bei der 3. Blutagarpassage wieder auf. Dasselbe Ergebnis zeitigten die Tierversuche bei den Fällen R 50, R 72 und E 3761. In sämtlichen Fällen bestand die Vergrünung fort. Kuscynski und Wolff (5) berichten über ähnliche Resultate, ihre Ergebnisse sind aber keineswegs so instruktiv. Das spätere Hämolysierungsvermögen, das Schnitzler und Pulvermacher (6) beobachteten, haben wir außerordentlich häufig gesehen, wie aus der oben besprochenen Aufstellung III her-

vorgeht. Ich glaube, daß diese ganzen Versuche dafür sprechen, daß man es mit fließenden Uebergängen zu tun hat.

Aus dem weiter oben Gesagten resultiert, wie wünschenswert es ist, ein Mittel an die Hand zu bekommen, das uns ermöglicht, zu sagen, ob es sich bei einer Kolonie um einen Vertreter der pathogenen oder apathogenen Gruppe handelt. Wir erblicken diese Lücke ausgefüllt durch die 1proz. Milchzuckerbouillon.

Ich möchte zunächst über die Stämme berichten, die bei den Tierversuchen ein negatives Ergebnis hatten. Es handelt sich um 85 Fälle von Rachenabstrichen (bei 33 außerdem Tonsillarabstrich und Sputum) von Gesunden und 14 Rachenabstrichen, die von Aerzten eingesandt worden waren. Die Milchzuckerbouillon verhielt sich nun bei den beiden Gruppen, wie es aus der Tabelle IV ersichtlich ist.

Tabelle IV.

Normale Mundhöhle.

Höhe des Bodensatzes in der Milchzuckerbouillon	Zahl der Fälle	Die über dem Bodensatz befindliche Flüssigkeitssäule war:			
		klar	trübe	stark trübe	sehr stark trübe
über 1,0 cm	26	(1)	5	20	1
„ 1,5 „	27	1 (3)	15	10	1
„ 2,0 „	21	2 (1)	8	4	7
unter 1,0 „	11	.	.	.	.
bis 0,9 „	2	.	.	2	.
„ 0,8 „	3	1	.	2	.
„ 0,7 „	3	.	.	1	2
„ 0,6 „	1	.	.	1	.
„ 0,5 „	1	.	.	.	1
„ 0,3 „	1	.	.	.	1
Von Aerzten eingesandt:					
über 1,0 cm	4	1	2	.	1
„ 1,5 „	3	.	3	.	.
„ 2,0 „	5	.	5	.	.
unter 1,0 „	2	.	.	.	.
bis 0,9 „	2	.	1	1	.

Das Bild, das sich uns bei den pathogenen Stämmen zeigt, ergibt sich aus der Tabelle V:

Tabelle V.

Normale Mundhöhle. Zahl der Fälle: 5.

Fall.

R 21: MB 1: +; an M 135 tot 15 Std.: MB 1: ±;
4: +; 5: ±;
5: +; 6: +.
6: +; an M 183 tot 30 Std.: MB 1: 0,1 +;
MB 3: 0,05 ±.

R 35: MB 4: —; an M 172 tot 15/20 Std.: MB 1: —; MB 2: —.
7: 0,1 —; an M 186 tot 28 Std.: MB 1: 0,1 —; MB 2: 0,1 —.
8: 0,2 —.

R 52: MB 1: 0,1 +; an M 206 tot 15/20 Std.: MB 1: 0,3 +;
3: 0,1 +; 3: 0,1 +.
4: 0,1 +;
5: 0,1 +; an M 229 tot 15/20 Std.: Aussaaten steril!

R 57:	MB 1: 0,2 —;	an M 211 tot 15/20 Std.:	MB 1: 0,1 +;
	3: 0,4 ±;		2: 0,2 +.
	4: 0,6 ++;		
	5: 0,6 ++;	an M 230 tot 15/20 Std.:	Aussaaten steril!
R 72:	MB 3: 0,2 —;	an M 246 tot 15/20 Std.:	MB 1: —;
	4: 0,1 —.		6: —;
			7: ±;
			8: —;
			10: 0,1 ±.

Von Aerzten eingesandt. Zahl der Fälle: 7.

E 3495:	MB 1: 0,1 —;	an M 89 tot 12/15 Std.:	MB 1: 0,1 —;
	5: 0,4 +.		4: 0,4 +.
E 3444:	MB 1: —:	an M 74 tot 15/20 Std.:	MB 1: 0,1 —;
	3: 0,2 —;		10: ++.
	5: —;		
	12: +.		
6:	MB 1: —;	an M 94 tot 15/20 Std.:	MB 1: 0,2 ±.
E 3682:	MB 1: —;	an M 150 tot 15/20 Std.:	MB 1: 0,2 ±.
	3: —;		
	5: —.		
E 3911:	MB 1: 0,2 —;		
	3: 0,1 +;		
	4: 0,3 +;		
	5: 0,1 +;	an M 203 tot 15/20 Std.:	MB 1: 0,1 +;
	6: 0,1 +;		3: 0,2 —.
	7: 0,2 +;		
E 3761:	MB 1: 0,2 +;	an M 173 tot 15/20 Std.:	MB 1: 0,2 ±;
	3: +;		3: 0,2 ±.
	4: 0,1 +;		
	5: 0,3 +.		
E 3662 II:	MB 1: 0,1 +;	an M 123 tot 30 Std.:	MB 1: 0,05 —;
	3: 0,2 —;		3: 0,05 —.
	5: 0,2 +.		

Anmerkung zur Tabelle V:
MB = Milchzuckerbouillon,
an M = an Maus ... intraperitoneal gespritzt,
MB 1 = Milchzuckerbouillon 1. Aussaat,
0,1 ... = Höhe des Bodensatzes nach 24stünd. Bebrütung in der Milchzuckerbouillon,
+++ = sehr stark trübe, daß kaum ein Bodensatz erkennbar,
++ = stark trübe,
+ = trübe,
± = ganz gering trübe oder flockig,
— = klar.

Eine Betrachtung der Tabellen zeigt in die Augen springende Unterschiede. Die apathogenen Stämme geben im allgemeinen einen hohen Bodensatz. Nur 2 von 99 Stämmen könnten als fragliche Fälle bezeichnet werden (Tabelle IV), bei denen aber betont werden muß, daß die Milchzuckerbouillon „sehr stark trübe" war. Die Zahl der apathogenen Stämme, die keine Trübung der Milchzuckerbouillon setzten, ist gering: 5 von 95 (die in Klammern gesetzten Zahlen bedeuten das gelegentliche Vorkommen einer klaren Bouillon in einer Versuchsreihe). Nur bei einem Fall blieb die Milchzuckerbouillon bei denen unter 1,0 ccm klar; hier wurde ein Bodensatz von 0,8 ccm festgestellt, den ich aber niemals bei den pathogenen gefunden habe. Man könnte geneigt sein, daß Fehlen einer Trübung darauf zurückzuführen, daß der in Frage stehende Mikroorganismus zu den weiter unten zu besprechenden Uebergangsformen zu rechnen ist. Andererseits sind die pathogenen Stämme, die von der ersten Blutplatte oder aus der Maus in

Milchzuckerbouillon überimpft wurden und mit Trübung wuchsen, als Uebergangsformen zu den apathogenen anzusehen. Ich glaube, daß aus diesen Tabellen klar die Eignung der Milchzuckerbouillon als gutes Differentialdiagnostikum hervorgeht. Interessant ist wohl die Tatsache, daß bei den Fällen, wo von der ersten Züchtung an, das mikroskopische Bild eine Neigung zur Kettenbildung zeigt, die Bouillon „gering trübe" oder „trübe" ist. Das gleiche gilt für die Fälle, wo sich nach Fortzüchtung das Wachstum in der Milchzuckerbouillon ändert (s. die Fälle R 57, E 3495, E 3911) und diese Wachstumsänderung einhergeht mit einer Aenderung des mikroskopischen Bildes. Ich darf betonen, daß ich dieses Verhalten auch bei einer ganzen Reihe anderer Fälle (so beim Strept. mucosus und Str. mucosus haemolyticus) gesehen habe. Bei diesen Fällen glaube ich, daß es sich um Uebergangsformen handelt. Bei dieser Gelegenheit kann vielleicht der Befund Erwähnung finden, daß die Zahl der aus der Mundhöhle von Rauchern bzw. Nichtrauchern gezüchteten pathogenen Stämme keinen Anhalt für die Annahme Yamagutis von dem relativ häufigeren Vorkommen gerade der pathogenen bei Rauchern ergeben hat. Auch sind meine allerdings mehr den Charakter von Vorversuchen tragenden Experimente über Virulenzsteigerung apathogener Stämme unter dem Einfluß bestimmter Chemikalien (u. a. auch Nikotin) bisher gescheitert.

Daß es uns gelingt, den Nachweis von Uebergangsformen zu führen, wird aus der folgenden Tabelle VI hervorgehen.

Tabelle VI.

Fall.

R 2: MB 2: 2,2 +; an M 102: lebt.
6: 0,3 —;
8: 0,5 —;
10: 0,1 —; an M 137: tot 15/20 Std.: MB 1: ±;
13: 0,6 +; 3: ±.
15: —;
16: —;
17: 0,3 ++; an M 178: lebt.

R 5: MB 2: 2,2 —; an M 105: lebt.
6: 0,4 —;
8: 0,05+;
10: 0,8 ++;
11: ±; an M 138: schwer krank, erholt.
16: —; an M 180: tot 72 Std.: Reinkultur von mucosusartigen m. Hämolyse u. Vergrünung: MB 1: 0,2 — ;
2: 0,5 — ;
9: 0,5 ++;
10: 0,3 — .

R 83: MB 2: 0,7 ±; an M 262: schwer krank nach 20 Std., getötet nach 40 Std. (s. u.).
3: 0,4 +;
4: 0,6 +; an M 278: lebt.
5: 0,4 +.
M 262: MB 2: 0,3 — ; an M 291 tot 15/20 Std.: MB 1: 0,7 ++;
2: 1,2 ++;
an M 305: lebt.
3: 1,3 + ;
4: 1,6 ++; an M 295: lebt.
5: 1,1 ++.

E 4091 II: MB 1: 0,3 ++;
2: 0,1 + ; an M 256 tot 15/20 Std.: MB: 1: 0,5 + ;
4: 0,3 ++; 2: 0,9 +++;
7: 0,4 ++; 3: 0,8 +++; an M 275 lebt.
8: 1,5 ++;
9: 1,3 ++; an M 294: lebt.
10: 1,3 ++.
R 55: MB 1: 0,5 ± ;
2: 0,2 ± ; an M 209: tot nach 15/20 Std. (s. u.).
4: 0,6 ++; an M 227: krank, gesund.
M 209: MB 1: 0,4 —;
3: 0,6 —;
4: 0,4 —; an M 241 tot 15/20 Std. (s. u.)
7: 0,1 —; an M 252 tot 15/20 Std. (s. u.).
8: 0,6 —; Flocken;
9: 0,5 —; Flocken.
M 241: Aussaaten aus allen Organen steril.
M 252: Aussaaten aus allen Organen steril.
R 3: MB 2: 0,5 —; an M 103: lebt.
3: 0,3 —; an M 116: tot 15/20 Std. (s. u.).
5: 0,5 —; an M 226: lebt.
8: 0,5 —;
11: 0,3 —;
14: 0,5 —;
M 116 MB 1: 0,3 —:
3: 0,5 —;
7: 0,1 —;
8: —; an M 175: tot 15/20 Std.: MB 2: —;
3: —.

Ich glaube, daß die Fälle R 2, R 83 und E 4091 II besonders charakteristisch sind. Es erübrigt sich wohl, auf diese Versuche näher einzugehen. Leider fehlen mir in dem Fall R 55 als viertem die letzten Beweise aus den Mäusen 241 und 252. Ob es sich bei R 5 tatsächlich um eine Umwandlung in einen Streptococcus mucosus haemolyticus im Tierkörper handelt, wage ich nicht zu beantworten. Auffällig ist hierbei das vergrünende Wachstum und daß die Maus erst nach 72 Stunden ad exitum kam. In einem anderen Fall sah ich eine Maus erst nach 4 Tagen zur Sektion kommen, die mit einem hochpathogenen Pneumokokkus intraperitoneal gespritzt war, während der Stamm in früheren Versuchen das Versuchstier bereits nach 15—20 Std. tötete. In diesem Falle züchtete ich aus Herzblut und allen Organen einen gleichfalls mit starker Vergrünung wachsenden Streptococcus mucosus ohne Hämolyse. Dieser Stamm tötete eine zweite weiße Maus intraperitoneal wieder nach 15 Std. und veränderte sich nicht. Auf Umzüchtungsversuche werde ich in einer späteren Mitteilung eingehender zurückkommen. Auch bei diesen Versuchen erwies sich bisher die Milchzuckerbouillon als ausgezeichneter Wegweiser für mancherlei Veränderungen in der Pathogenität und anderen Eigenschaften der Stämme.

In einer besonderen Arbeit werde ich ausführlich die Veränderungen in den PH-Konzentrationen von Nährmedien beimpft mit apathogenen und pathogenen Kokken besprechen. Im Rahmen dieser Untersuchungen möchte ich ganz kurz zusammenfassen, daß das verschiedene Wachstum in der Milchzuckerbouillon seine Bestätigung findet in einer verschiedenen PH-Konzentration (an der Gaskette gemessen). Ich beimpfte 3 Röhrchen mit 10 ccm einer 1proz. Milchzuckerbouillon von einem PH-Wert von 6,88 mit dem Pneumokokkenstamm R. (Maus tot nach 15—20 Std.) sowie mit 2 apathogenen Milchsäurestreptokokken-

stämmen N. R. II und N. R. IV. Nach 24stünd. Bebrütung ergaben sich folgende Werte:

Ausgangswert	: P_H 6,88		
Pneumokokkus R	: P_H 6,04	MB: gering flockig, klar.	
Milchsäurestreptokokkus NR II:	P_H 4,56	MB: 0,9 cm, stark trübe.	
Milchsäurestreptokokkus NR IV:	P_H 4,85	MB: so stark trübe, daß kein Bodensatz erkennbar ist.	

Die apathogenen Stämme zeichnen sich also durch eine ganz beträchtliche Säuerung des Nährbodens aus, während der pathogene nach 24stünd. Bebrütung nur eine relativ sehr geringe Säuerung der Milchzuckerbouillon setzt. Ich darf hervorheben, daß diese Lanzettkokken sämtlich dem Typ IIa angehören, also morphologisch und biologisch auf der Platte nicht von den pathogenen zu unterscheiden sind. Weiterhin wurde ein Röhrchen mit einem apathogenen Milchsäurestreptokokkus H. und ein zweites mit einem frisch aus der Maus 304 isolierten Streptococcus mucosus beimpft. Bei einem Ausgangs-P_H-Wert von 6,8 für beide Röhrchen wurde für den apathogenen ein P_H-Wert von 3,77 (Milchzuckerbouillon: 1,0 ccm, stark trübe) und für den pathogenen P_H 6,13 (MB: klar, gering flockig) nach 24stünd. Bebrütung gefunden. Interessieren dürften vielleicht des weiteren die Veränderungen, die ein Milchsäurestreptokokkus, aus Katheterurin isoliert, den Meyer (7) als Enterococcus bezeichnen möchte, in der P_H-Konzentration der Nährflüssigkeit setzt. Bei einem Ausgangs-P_H-Wert von 6,58 wurde nach 24stünd. Bebrütung ein P_H-Wert von 4,70 gemessen. Ganz allgemein darf ich zum Schluß sagen, daß sich für die Versuche am besten eine 1proz. Milchzuckerbouillon eignet, die einen P_H-Wert um 7,07 bei 18° bis 22° hat.

Zusammenfassung.

Die Untersuchungen über das Vorkommen von Pneumokokken in der Mund- und Rachenhöhle Gesunder ergaben, daß nur in 10,5 Proz. der Fälle mäusepathogene Lanzettkokken, in 89,5 Proz. dagegen apathogene (= Milchsäurestreptokokken) gefunden wurden und daß das Vorkommen von Pneumokokken bei Gesunden damit als selten anzusehen ist.

Die 1proz. Milchzuckerbouillon, die am besten eine P_H-Konzentration von 7,07 hat, ist als ein gutes Differentialdiagnostikum zur Unterscheidung von Milchsäurestreptokokken und Pneumokokken anzusprechen, und sie ist geeignet, die Pathogenitätsprüfung an der weißen Maus einigermaßen zu ersetzen.

An Hand von zahlreichen Tierversuchen in Verbindung mit der Milchzuckerbouillon ist die Annahme von fließenden Uebergängen zwischen pathogenen und apathogenen Streptokokken berechtigt.

Nach 24stünd. Bebrütung zeigen Messungen der P_H-Konzentrationen in den Nährmedien an der Gaskette zwischen pathogenen und apathogenen Streptokokken ganz bedeutende Unterschiede.

Literatur.

1) Bitter und Buchholz, Centralbl. f. Bakt. Orig. Abt. I. Bd. 95. 1925. — 2) Neufeld, ebendas. Bd. 93. S. 1—4. — 3) Heim, Ztschr. f. Hyg. Bd, 101, 4) Yamaguti, Centralbl. f. Bakt. Orig. Abt. I. Bd. 90. — 5) Kuczynski u. Wolff, Berl. klin. Woch. 1922. — 6) Schnitzler u. Pulvermacher, Münch. med. Woch. Bd. 70. — 7) Meyer, Klin. Woch. 1924.

Nachdruck verboten.

Experimentelle Untersuchungen über Pocken-Neurolapine.

[Aus dem bakt. Laboratorium der Bakteriolog. Abt. des Reichs-Gesundheitsamtes.]

Von **Kurt Herzberg.**

Nachdem im Jahre 1901 Calmette und Guérin erstmalig beschrieben haben, daß in das Hirn von Kaninchen verimpfte Pockenlymphe dort 4 Tage virulent bleibt, und nachdem von Henseval (1910) und Noguchi (1915) die Möglichkeit der Pockenpassage von Kaninchenhoden zu Kaninchenhoden erwiesen worden war, zeigten 1920 Marie, 1921 Levaditi, Harvier und Nicolau und etwas später Krumbach, daß das Vakzine- oder Hodenvirus erfolgreich auf das Hirn gebracht werden kann und von dort eine im allgemeinen typisch verlaufende tödliche Infektion des Kaninchens bedingt. Das Hirn solcher Tiere (Pocken-Neurolapine)[1]) wurde von Levaditi und seinen Mitarbeitern in einer großen Reihe von Tierversuchen geprüft; sie haben darüber zusammenfassend in den Ann. de l'Institut Pasteur berichtet.

A. Tierempfänglichkeit.

Für Pocken-Neurolapine empfänglich zeigten sich: das Kaninchen (bei intrazerebraler, kutaner und intravenöser Impfung), das Meerschweinchen (intrazerebral), Ratte und Maus (kutan skarifiziert), Katze (intrazerebral), Kalb (kutan skarifiziert), Macacus cynomolgus (kutan skarifiziert); nicht empfänglich waren der Hahn bei intrazerebraler und kutaner Impfung (am Kamm) und der Macacus cynomolgus bei intrazerebraler Injektion.

B. Eintrittswege beim Kaninchen.

Die Pocken-Neurolapine haftet direkt in folgenden Organen: im Hirn, auf der Cornea, der rasierten und epilierten Haut, den Hoden, der Mundschleimhaut.

Eine Ausbreitung des Virus wurde in folgenden Kombinationen beobachtet: vom Hirn zur epilierten Haut und zur Maulschleimhaut, umgekehrt von der Haut zum Hirn. Von der Trachea zur epilierten Haut, von den Hoden zur epilierten Haut und zum steril verletzten Hirn (Bouilloninjektion), von der Subcutis zur Epidermis, von den peripheren Nerven (Ischiadicus) zum Rückenmark und Hirn, von der Blutbahn zur epilierten Haut (Bestätigung früherer Vakzineversuche von Calmette und Guérin) und zur verletzten Cornea (Skarifizierung oder X-Strahlen). In der Bauchhöhle rief das Virus keine Veränderungen hervor.

C. Eigenschaften der Pocken-Neurolapine.

Die Pocken-Neurolapine ist für das Kaninchen besonders virulent. Bei intrazerebraler Injektion tötete sie von den ersten 100 Passagen 85 Proz. der Tiere zwischen 4. und 7. Tag, vor dem 4. Tag starben 7, nach dem 7. Tag 8 Proz. der Tiere. Von der 100. zur 200. Passage steigerte sich die Virulenz noch, so daß 96 Proz. bis

1) Levaditi spricht von Neurovakzine. In Anbetracht des Umstandes, daß wir Impfstoff vom Kaninchen mit Lapine zu bezeichnen pflegen, wurde in der vorliegenden Arbeit durchgängig für Neurovakzine der Name Neurolapine angewendet. Es ist diese Trennung notwendig, weil z. B. von Krumbach der Vorschlag gemacht worden ist, Hirnimpfstoff von Kälbern zu gewinnen. Nur dieser sollte Neurovakzine genannt werden. Da nun weiterhin mehrere Vira im Kaninchenhirn in Passagen gezüchtet werden können, so muß noch die Angabe des Erregers hinzugefügt werden; es ist also z. B. zwischen Herpes-Neurolapine und Pocken-Neurolapine zu unterscheiden.

zum 6. Tag getötet wurden. Nachdem die Hirnpassagen 9 Monate lang fortgesetzt waren, betrug der Titer am Kaninchen für kutane Impfung 1:50000, intrazerebral 1:100000. Glyzerinkonservierung hielt die Pocken-Neurolapine bei Eistemperatur mindestens 200 Tage virulent. Filtrationsversuche mit Pocken-Neurolapine ergaben nur einmal mit einer Chamberland-Kerze Nr. 1 ein positives Resultat. Filtrate durch Chamberland 2 und 3 waren stets negativ. Durch die Hirnpassagen war die Pocken-Neurolapine für die schädigende Wirkung der Galle und Erhitzung auf 55° C empfänglicher geworden. Vergleiche mit gleichzeitig von Kaninchen gewonnener Dermolapine ergaben, daß diese sowohl 1stünd. Erhitzen auf 55° wie Einwirkung von Galle (1:1, 24 Std. bei Zimmer-, 24 Std. bei Eistemperatur) verträgt, während Pocken-Neurolapine durch die Erhitzung völlig vernichtet, durch die Galle stark abgeschwächt wurde. Außer dieser Unterschiedlichkeit wies noch das biologische Verhalten beider Vira Differenzen auf. Einerseits reagierte die Haut des Hahnenkammes wohl auf Dermo-, nicht aber auf Pocken-Neurolapine, während umgekehrt beim Kaninchen intratestikulär injiziert wohl die Neuro-, nicht aber die Dermolapine sich bis zum Hirn des Kaninchens ausbreitete. Auch der Impfeffekt auf der Haut des Kaninchens war bei der Pocken-Neurolapine ein anderer (intensive Rötung, Oedem, Infiltration, langsame, zuweilen Wochen dauernde Heilung) als bei der Dermolapine (Pustelbildung, schnelle Heilung).

D. Beziehung zu den Keimblättern.

Es ist von mehreren Autoren darauf hingewiesen worden, daß die Ansiedlung der ultravisiblen Vira im Organismus einer Spezifität der Gewebe gehorcht (Borrel, Burnet, Lipschütz, Levaditi, Menze), die zu den Keimblättern in Beziehung steht (Lipschütz, Levaditi). Borrel schuf hier für die Erreger der Variola, Vakzine, Schafpocken, des Molluscum contagiosum und des Epithelioma contagiosum der Vögel den Ausdruck „Epitheliosen", da diese Vira sich hauptsächlich in epithelialen Gebilden ansiedeln. Levaditi hat diese Feststellung erweitert und den Satz ausgesprochen, „daß die Infektionen des Mesoderms — die Mesodermosen — gewöhnlich durch Bakterien, Pilze, Spirillen oder Protozoen, mit einem Worte durch züchtbare und meist kultivierbare Mikroorganismen hervorgerufen würden, während die Ektoderminfektionen — die Ektodermosen — in der Mehrzahl der Fälle durch filtrierbare, unsichtbare Erreger bedingt seien"[1]). Von diesen Ektodermosen teilt Levaditi nun die Gruppe der neurotropen Ektodermosen ab, zu der er die Erreger der Pocken, des Herpes, der Encephalitis epidemica, Poliomyelitis und Lyssa rechnet. Seine und seiner Mitarbeiter Untersuchungen bezüglich des Gewebstropismus der Pocken-Neurolapine hatten folgendes Ergebnis: Injizierte man Kaninchen intravenös Pocken-Neurolapine, tötete die Tiere zwischen dem 6. und 10. Tag und untersuchte auf Pockengehalt durch Verreiben der Organe auf der skarifizierten Kaninchenhaut, so enthielten Pockenvirus: von ektodermalen Geweben die epilierte Haut, die verletzte Cornea, die Mamma, die Maulschleimhaut, das verletzte Gehirn und die Nebennierenrinde. Von entodermalen Geweben: Leber und Lunge (die hier nur die Rolle eines Filters spielt). Dagegen waren Gebilde mesodermaler Herkunft wie das Knochenmark, die Muskeln, Lymphknoten sowie das Blut stets frei von Pockenvirus. Meist negativ fiel die Untersuchung der Milz und der Nieren aus, gelegentlich waren jedoch schwache Impferfolge zu verzeichnen. Besonders starken Virusgehalt zeigten aber auch ohne Verletzung die (vom Mesoderm abstammenden) Ovarien und Hoden.

Aehnliche oder gleiche Befunde bezüglich des Blutes, Knochenmarks, der Milz, Niere, Wangenschleimhaut und Hoden waren schon früher von Calmette und Guérin, Henseval, Noguchi sowie Camus bei Verwendung von Vakzine beschrieben. Gegenüber diesen Befunden ausländischer Autoren, die nur das Vorhandensein des dem Kalb oder Kaninchen einverleibten Pockenerregers in den verschiedenen Organen feststellen wollten, wurde in mehreren deutschen Arbeiten die Frage aufgeworfen, ob der Erreger im Organismus des Kaninchens oder Kalbes nach kutaner, intravenöser oder intraperito-

1) Eine Erörterung über die Zulässigkeit dieser Abgrenzung fällt nicht in den Rahmen dieser Arbeit. Von Lipschütz ist bereits eine Kritik gegeben worden, welche zu den historischen und experimentellen Angaben Levaditis Stellung nimmt (Wien. klin. Woch. 1922, S. 545).

nealer Impfung zu kreisen vermöge. Diese Frage war bedingt durch die Klinik der menschlichen Pockenerkrankung, deren Erscheinungsformen ein Kreisen des Erregers im Blute voraussetzt. Die Generalisation beim Menschen wollte man auch am Tier nachweisen, aber fast durchgängig wurde, wenn man von den Angaben Vanselows und Freyers absieht, festgestellt, daß selbst große Mengen kutan, subkutan, intraperitoneal und intravenös verabfolgter Vakzine schon nach wenigen Stunden im Organismus nicht mehr aufgefunden werden können. So fanden Prowazek und Yamamoto, daß das intravenös injizierte Vakzinevirus im zirkulierenden Blut nach einer, im Knochenmark nach 2, in der Leibeshöhle nach 4 Std. verschwindet. Vorher hatte Prowazek an 60 kutan, korneal und intraperitoneal mit Vakzine geimpften Kaninchen Organprüfungen angestellt, die sich über einen Zeitraum von 16 Std. bis 57 Tagen erstreckten. In keinem Falle konnte in Milz oder Niere der Pockenerreger nachgewiesen werden. Entsprechende Untersuchungen wurden von Mühlens und Hartmann, Paschen, Gins und Weber sowie Süpfle ausgeführt. In den Versuchen von Mühlens und Hartmann enthielten Niere, Leber, Milz, Knochenmark, Lymphdrüsen, Gehirn und Blut von Kaninchen nach subkutaner, kutaner, intraperitonealer und intravenöser Impfung zwischen 5. und 7. Tag kein Virus. Gins und Weber konnten nur bis zur 5. Std. nach intravenöser Injektion in der Milz Virus nachweisen, Paschen fand im Gegensatz zu Vanselow und Freyer die Milz und Lymphdrüsen hautgeimpfter Kälber virusfrei und Süpfle konnte nach subkutaner Injektion am Kaninchen vom 1.—10. Tag durch Rasieren keine Pustelbildung an den Hautflächen erzielen. Auch Jürgens fand nach kornealer Impfung im Kaninchenkörper kein Virus; die geprüften Organe sind von ihm nicht angegeben. Vereinzelte positive Befunde von v. Wasielewski in der Niere am 5. Tag nach kornealer Impfung und von Gins und Weber am 4. Tag in der Milz nach kutaner Impfung ändern an dem Gesamtbild nichts, daß ein Kreisen des Vakzineerregers im Kaninchenkörper innerhalb großer Zeiträume nicht festgestellt werden konnte. Wie die oben erwähnten Organe zeigen, hatte man solche Gewebe zum Nachweis des Erregers gewählt, die auch bei den Untersuchungen von Calmette und Guérin, Camus, Levaditi u. a. negative Befunde ergeben hatten, während die dort positiv ausgefallenen nicht oder (wie die Haut) ohne Erfolg untersucht worden waren. Die Frage, ob der Erreger kreise, ist in Analogie der Verhältnisse beim Menschen gestellt worden; dadurch ist aber, wie die Untersuchungen Levaditis ergeben, zu sehr an den Verlauf septikämischer Erkrankungen gedacht worden, was auch die zur Prüfung und Beweisführung verwendeten Organe (Milz, Knochenmark, Lymphdrüsen, Nieren) bestätigen. Heute kann man sagen, daß es zur Erkennung der Wege, die der Pockenerreger im Kaninchenorganismus einschlägt, aussichtsreicher gewesen wäre, allgemeiner zu fragen, ob und wo es im Kaninchen zu einer Vermehrung und Ausbreitung des Pockenvirus kommt; denn die Untersuchung würde ergeben haben, daß zwar ein Kreisen der Vakzine wie bei den septikämischen Prozessen nicht stattfindet, daß aber bestimmte Organe zur Viruserhaltung und -Vermehrung geeignet sind, von denen aus es dann zur allgemeinen Infektion des Organismus kommen kann (Noguchi, Levaditi, Nodake, Biglieri). Die Befunde von Paschen, Gins und Weber, Süpfle, Mühlens

und Hartmann, Prowazek und Yamamoto stimmen ja durchaus mit denen von Levaditi, Calmette und Guérin überein, was das Nichtvorkommen des Pockenerregers in den Organen hauptsächlich mesodermaler Herkunft anbetrifft. Wenn darüber hinaus die letztgenannten Autoren auch eine große Anzahl positiver Befunde erhielten, so verdanken sie dies einer veränderten Insertion des Pockenerregers (testikulär oder intrazerebral) und der Ausdehnung der zu prüfenden Organe auf solche des ektodermalen Systems. Die Verwendung unterschiedlichen Impfmaterials (Vakzine einerseits, Pocken-Neurolapine andererseits) ist ohne Bedeutung, da man auch durch erstmalige Impfung mit Vakzine in das Kaninchengehirn (Marie, Burnet und Conseil) eine typische Encephalitis vaccinica erzielt.

Auch die Versuche von Uhlenhuth und Bieber weisen darauf hin, daß das schnelle Verschwinden des Virus nicht mit Vernichtung zu identifizieren ist, denn mit Pockenlymphe intravenös gespritzte Rinder bekamen zwischen dem 6. und 18. Tage papulo-pustulöse Exantheme und typische Pockenpusteln der Maulschleimhaut. Dementsprechend bestätigen die Angaben von Watanabe, der die Kaninchen zwischen 4. und 9. Tag tötete, die Organprüfungsergebnisse von Levaditi, Calmette und Guérin sowie Camus. Tiere, die zwischen dem 4. und 9. Tag entblutet wurden, wiesen im Blut, Knochenmark, Herzmuskel und unverletztem Gehirn nie, in Milz, Leber und Niere gelegentlich, häufig und in beträchtlich größerer Menge in Haut und Schleimhaut Virus auf. Bei Immuntieren ließ sich das Virus zu keiner Zeit auffinden.

Sehr bemerkenswert sind die Ergebnisse von H. A. Gins. Er versuchte, die Erfahrungen von Noguchi, Calmette und Guérin sowie Levaditi und Nicolau beim Meerschweinchen anzuwenden. Es zeigte sich aber, daß mit frischer Lymphe, Rohstoff oder Glyzerinlymphe beim Meerschweinchen weder eine Hoden- noch eine Hirninfektion erzielt werden konnte. Das injizierte Virus war nach 4×24 Std. aus den Geweben verschwunden, ohne besonders deutliche Immunitätserscheinungen an Haut oder Cornea zu hinterlassen.

Dagegen konnte Krumbach an Kaninchen mit Neurolapine 20 Passagen erzielen. Die Mehrzahl der Tiere ging wie in den Versuchen von Levaditi, Nicolau und Harvier, zwischen 4. und 6. Tag nach der intrakraniellen Impfung ein. Der klinische Verlauf glich dem, der von den französischen Autoren beschrieben worden ist. Von Organen prüfte Krumbach nur das Lumbalmark, das sich am 2. Tage nach der Impfung als virushaltig erwies. Krumbach hatte es sich vor allem zur Aufgabe gemacht, durch die zerebrale Passage einen keimfreien Impfstoff zu gewinnen. Seine Ergebnisse werden zugleich mit denen Levaditis in dem letzten Abschnitt der jetzt zu schildernden Untersuchungen besprochen.

I. Kaninchenhirnpassagen.

Als Ausgangsmaterial für meine Tierversuche diente ein Pockenimpfstoff, der dem Reichsgesundheitsamt von Herrn Regierungs-Medizinalrat v. Einsiedel (Vorsteher der Staatl. Impfanstalt in Dresden) freundlichst überlassen war. Vor seiner Verwendung war er nach der von Kirstein empfohlenen Methode durch Eukupinotoxinzusatz (1:5000) von gewöhnlichen Keimen befreit worden. Zur Gewöhnung an den Kaninchenkörper wurde das Virus zunächst einem Kaninchenbock testikulär injiziert (0,3 ccm). Diese Impfung bedingt unter Erscheinungen, die von Noguchi an 60 Passagen ausführlich studiert worden sind, eine außerordentliche Vermehrung des Erregers im Hodengewebe. Der bereits am zweiten Tag stark geschwollene Hoden wird exstirpiert und in einem abgedeckten Mörser zerrieben. Nach Zusatz von 5 ccm 0,85proz. Kochsalzlösung werden 0,2 ccm der Flüssigkeit einem Kaninchen nach Trepanation des linken Parietale intrazerebral injiziert. In gleicher Weise wurden später die Gehirne der an der Pockeninfektion verstorbenen Kaninchen von Tier zu Tier ver-

impft. Meine Erfahrungen über die Fortzüchtbarkeit des Pockenvirus im Kaninchenhirn seien kurz zusammengefaßt.

Geht die Infektion an, so ist ihr Verlauf meist typisch. Am 1. und 2. Tag frißt das Tier noch, am 3. ist es apathisch, läßt das Futter unberührt und zieht sich in den Käfig zurück. Zuweilen wird reichlicher Speichelfluß beobachtet. Am 4. Tag ist die Fortbewegung unsicher und gehemmt, am 5. oder 6. Tag liegt das Tier mit Lähmungserscheinungen auf der Seite. Unter Opisthotonus, Zähneknirschen und gelegentlichen Jaktationen, zuweilen von Schreien unterbrochen, stirbt das Kaninchen. Abweichungen von diesem Verlauf kommen vor. Die Krankheitserscheinungen äußern sich dann beschleunigt oder verzögert (Exitus zwischen 4. und 11. Tag). Eine Kurve, die die Verteilung der Todesfälle auf die einzelnen Tage angibt, veröffentlicht Levaditi. Die Mehrzahl der Tiere stirbt zwischen dem 5. und 6. Tag. Auffälliger als diese Zeitschwankungen sind bei manchen Tieren Erscheinungen völliger Unempfänglichkeit für ein sicher virulentes Virus. Ich verfüge unter den bisher durchgeführten 35 Passagen über zwei Kaninchen, bei denen die zerebrale Infektion auch nach Wochen nicht zum Tode führte. Eine 14 Tage nach der Trepanation an diesen Tieren vorgenommene Corneaimpfung mit Pockenvirus ergab beidemal starke Zerstörungen. Sieht man von diesen Ausnahmen ab, so gelingt die Passage leicht. Die Temperatur entsprach im Durchschnitt den von Levaditi und Krumbach angegebenen Kurven. Im typischen Falle, d. h. bei 6 Tage währendem Krankheitsverlauf, findet man am Tage nach der intrazerebralen Impfung einen Fieberanstieg bis auf 41° C, am 2. und 3. Tage einen Abfall auf 40°, am 4. Tage einen erneuten Anstieg auf etwa 41°, dann steilen Abfall der Temperatur bis auf 36°. (5.—6. Tag; Exitus.)

Zum Zwecke der Tierersparnis wurde das zerriebene Hirnmaterial mit Glyzerin 1,23 D im Verhältnis 1:1 oder 1:2 bei einer Temperatur von 8° C wochenlang aufbewahrt; es war so jederzeit gut virulentes Infektionsmaterial zur Verfügung.

II. Virusverteilung im Kaninchenkörper.

Ueber das Vorhandensein von Pockenvirus in den verschiedenen Organen von Kaninchen, die einer intrazerebralen Injektion mit Pocken-Neurolapine erlegen waren, habe ich größere Untersuchungsreihen ausgeführt. Das von Levaditi in dieser Richtung geübte Verfahren, die intravenöse Einverleibung des Pockenvirus, zeichnet sich durch ganz besonders günstige Versuchsbedingungen bezüglich einer Virusverteilung in den Organen aus. Um eine mechanische Begünstigung einzelner Gewebe und Organe (Filterwirkung) auszuschließen, wurde daher der intrazerebrale Infektionsmodus gewählt. Das Ergebnis wich aber von dem Levaditis kaum ab. Zur Entscheidung, ob Organmaterial virushaltig war oder nicht, wurde entweder der Paulsche Versuch oder die intrakutane Impfung herangezogen.

Ausführung der Cornealimpfung: Das kokainisierte Kaninchenauge wird aus der Orbita gehoben und die Cornea mittels feiner Lanzette durch 4 senkrechte und 4 wagerechte Striche geritzt (16 Schnittpunkte). Die Organprüfung folgt unmittelbar darauf durch direktes Verreiben kleiner Organstücke auf der Cornea. Der Paulsche Versuch wird nach 2 oder 3 Tagen ausgeführt.

Ausführung der intrakutanen Impfung (nach Groth): Das zu untersuchende Organstück wird im Achatmörser gut zerrieben, mit etwas 0,85proz.

NaCl-Lösung verdünnt, 6 intrakutane Quaddeln zu je 0,1—0,2 ccm an der rasierten Kaninchenflanke angelegt.

An Hand dieser Prüfungsmethoden ließ sich in folgenden Organen bzw. Flüssigkeiten nach intrazerebraler Pocken-Neurolapineinfektion verendeter Kaninchen das Virus nachweisen: Haut, Ovarium, Nebennieren, Leber, Milz, Brust-, Hals-, Lendenmark, Ischiadicus, Peritonealexsudat (nach Aleuronatinjektion am 4. Tage), durch Bouilloninjektion gereizter Hoden. Frei von Virus waren die Lunge, das Blut, der ungereizte Hoden. Jedes der genannten Organe ist mindestens von 2 Tieren gewonnen und 2mal geprüft worden.

Bis auf die Versuche mit ungereizten Hoden und mit Lunge, die bei Levaditi positiv ausfielen, stimmen die Befunde mit denen der französischen Autoren überein. Die bevorzugte Ansiedelung des Pockenerregers in Gebilden des äußeren Keimblattes läßt sich also auch bei einem Infektionsmodus konstatieren, der eine primäre, direkte Verbreitung des Virus durch die Blutbahn unwahrscheinlich macht.

Mehrere Versuche, eine Spontaninfektion durch Zusammensetzen schwer kranker mit gesunden Kaninchen zu erzielen, verliefen ergebnislos, auch dann, wenn das Gehirn durch Trepanation und Injektion von Kochsalzlösung künstlich geschädigt war. Levaditi sind solche Infektionen in seltenen Fällen gelungen.

III. Ausschleuderungs-, Filtrations- und Adsorptionsversuche.

a) Ausschleuderungsversuche.

Die Untersuchungen über die Auszentrifugierbarkeit des Pockenvirus wurden unternommen, als Dahmen die Möglichkeit einer Ausschleuderung des Maul- und Klauenseucheerregers durch zweistündiges Zentrifugieren bei 3000 Touren mitteilte. Die Nachprüfung seiner Angabe führte im Reichsgesundheitsamt zu keiner Bestätigung. Von den gleichzeitig ausgeführten Untersuchungen mit dem Pockenerreger sei die Anordnung geschildert.

Versuch. 7 g Hirn eines an intrazerebraler Pockenimpfung frisch gestorbenen Kaninchens werden mit 5 g Seesand $^1/_2$ Std. gemörsert, mit 35 ccm 0,85proz. Kochsalzlösung verdünnt und 3mal innerhalb 3 Std. in einer Kältemischung (— 8°) gefroren. Danach wird der Brei 1:10 mit 0,85proz. Kochsalzlösung verdünnt und von seinen groben Partikeln und dem Sand durch 5 Min. langes Ausschleudern in der Wasserzentrifuge (1000 Touren) befreit. Die überstehende, noch stark getrübte Flüssigkeit wird in der elektrischen Zentrifuge 90 Min. zentrifugiert (Zentrifugengläser ohne Knick, 40 ccm fassend, mit 25 ccm Flüssigkeit gefüllt; Umdrehungszahl 3000, Entfernung der Zentrifugenmitte bis zur Zentrifugenhülsenmitte 11 cm). Die Viskosität wurde nicht untersucht, da die Suspension nach obigen Angaben genau reproduzierbar ist. Der Zentrifugenklar ist nach dem Ausschleudern bläulich-opaleszent. Die Prüfung des Ausgangs- und Endmaterials im Paulschen Versuch ergibt:

Pocken-Gehirnsuspension, Ausgangsmaterial: völlige Corneazerstörung.

Bodensatz der Pockengehirnsuspension, 90 Min. 3000 T. zentrif.: völlige Corneazerstörung.

Zentrifugenklar der Pockengehirnsuspension, 90 Min. 3000 T. zentrif.: etwa 50 Herde.

In einem anderen Versuche wurde eine Aufschwemmung verwendet, die nach vorbereitendem Zentrifugieren (10 Min. bei 3000 Touren) mit 0,15 ccm[1]) etwa 12 Defekte auf der Kaninchencornea verursachte. Nach 90 Min. langem Ausschleudern erzeugten 0,15 ccm 6 Herde. Die Prüfung erfolgte stets an zwei Augen. Ein dritter Versuch ergab:

Zentrifugenklar einer Pockenhirnsuspension, die 15 Min. bei 3300 Touren zentrifugiert war, etwa 45—50 Hornhautherde. Dieser Zentrifugenklar weitere 60 Min. bei 3300 Touren zentrifugiert: etwa 30 Hornhautherde durch je 0,15 ccm.

In einem entsprechenden vierten Versuch wurden sowohl von dem 15- als auch von dem 75 Min.-Zentrifugenklar etwa 20 Herde durch 0,15 ccm auf der Kaninchencornea verursacht. (Tourenzahl 3500.)

Man kann das Ergebnis dahin zusammenfassen, daß in pockenhaltigen Hirnbreiaufschwemmungen ein großer Teil des Virus, weil an den groben Partikeln haftend, durch kurzdauerndes Zentrifugieren in den Bodensatz gebracht werden kann. Dieser Befund sagt aber über die wahre Ausschleuderbarkeit des Virus nichts aus, denn selbst nach 90 Min. langem Zentrifugieren bei 3000—3500 Touren war unter den hier gewählten Bedingungen stets Pockenvirus im Zentrifugenklar nachweisbar, zum Teil in erheblicher Menge.

b) Filtrationsversuche.

Es soll hier nicht ein neuer Beitrag zu der oft diskutierten Frage, ob das Pockenvirus filtrierbar ist oder nicht, gegeben werden. Diese Fragestellung kann wohl aus der Erörterung ausscheiden, da kaum jemand daran zweifelt, daß die Virusgebilde in ihrer Größenordnung hinter dem Durchmesser der kleinsten Poren von Berkefeld-Kerzen zurückbleiben. Wenn trotz dieser Größenverhältnisse die Filtration von Pockenvirus sehr selten gelingt, so weist dies darauf hin, daß die Filtrierbarkeit eine Frage der guten Aufschließung des pockenhaltigen Gewebes und eine Frage des Kerzenmaterials sein muß. Negris Filtrationsversuche mit mazeriertem Pockenmaterial sowie die Adsorptionsuntersuchungen von Gins sprechen für diese Auffassung.

Berechtigung haben diese von Zeit zu Zeit in der Literatur wiederkehrenden Untersuchungen auf Grund der Hoffnung, schließlich doch noch einmal durch Filtration einen keimfreien Pockenimpfstoff herstellen zu können.

Zur Aufschließung des Pockenmaterials, das in Form von pockenhaltigen Kaninchenhoden oder -hirn zur Anwendung kam, wurden folgende Verfahren versucht:

1) Hirn oder Hoden eines frisch verendeten, mit Pocken-Neurolapine intrazerebral oder testikulär geimpften Kaninchens wird mit Seesand $^1/_2$ Std. im Achatmörser zerrieben, mit 0,85proz. Kochsalzlösung 1:60 verdünnt. Nach 8 Tage langer Aufbewahrung bei einer Temperatur von

1) Die Abmessung erfolgte hier wie in allen späteren Versuchen in 1 ccm-Pipetten mit $^1/_{100}$ Teilung, aus denen die virushaltige Flüssigkeit sehr langsam und unter ständigem Reiben des unteren Pipettenendes auf der stets in der gleichen Art skarifizierten Hornhaut (16 Schnittpunkte) zum Auslaufen gebracht wurde. Die guten Uebereinstimmungen bezüglich der Zahl der Herde, die bei genügend verdünnten und daher auszählbarem Virusgehalt auf mehreren mit derselben Menge desselben Materials geimpften Cornae erhalten wurden, ermöglichte auch den zahlenmäßigen Vergleich verschiedenen Materials in Bezug auf die Menge an epithelzerstörenden Virus-Einzelteilchen.

6° C wird das Material an 4 Tagen je 3mal bei —8° C gefroren und schnell wieder aufgetaut, sodann zur Filtration verwandt.

2) In gleicher Weise behandeltes Material wird nach dem letzten Auftauen mit $n/_1$ NaOH auf PH 7,5 alkalisiert, 5 Std. bei 37° mit Trypsin (Kahlbaum, Merck, Rhenania, 5 Proz. Zusatz) verdaut, sodann nach 1stünd. Schütteln mit Glasperlen im Pulverglas zur Filtration verwandt.

3) Versuch wie unter 1), doch folgt dem Auftauen eine 3stünd. Pepsinverdauung in einem Acetatpuffergemisch von PH 4,8 bei Gegenwart von $m/_4$ NaCl. Diese von Rona und Mislowitzer bei Autolyseversuchen aufgefundene und dort sehr wirksam befundene Kombination eines relativ schwach sauren Mediums mit hohem Elektrolytzusatz mußte jedoch hier aufgegeben werden, da sie das Virus doch noch zerstörte.

4) Ebenso scheiterte wegen zu starker Viruszerstörung der Versuch, die Hirnemulsion durch Ausschütteln mit Aether (Fabrikat Piktet und Schering) lipoidarm zu machen. Es sollte auf diese Weise der Verschmierung der Kerzenporen durch Fettsubstanzen vorgebeugt werden.

Weitere Verfahren wurden zunächst nicht erprobt. Es blieben daher nur die unter 1) und 2) genannten Methoden, die ein genügend wirksames Virus ergaben. Statt mit der Verdünnung 1:60 wurde in einigen Fällen 1:120, 1:300 und 1:1000 filtriert. Filterkerze Berkefeld V. In zwei Versuchsreihen de Haens Membranfilter 0,6—0,75—1,26 und 2 μ. Druck zwischen 400 und 500 mm Hg variiert, bei den de Haen-Filtern 30—40 mm.

Filtrationsergebnis: In keinem Falle ist es gelungen, im Filtrat mittels des Korneal- oder Intrakutanversuchs Pockenvirus nachzuweisen. (Unfiltrierte Kontrollen stark positiv.) Es ist in diesen Versuchen noch nicht berücksichtigt, daß man sich durch kurzdauerndes, etwa 15 Min. währendes Zentrifugieren einen ungefähren Anhalt verschaffen kann, wieweit das Virus an größeren Partikeln haftet, oder (wahrscheinlich) frei in der Flüssigkeit schwebt. Zweckmäßig wird man nur solche Aufschwemmungen zur Filtration verwenden, die etwa nach $^1/_4$stünd. Zentrifugieren bei 3000 Touren im Zentrifugenklar noch mindestens einen Titer von 1:50 haben.

c) Adsorptionsversuche.

Die starke Adsorbierbarkeit des Pockenvirus ist durch die Arbeit von Kraus, Eisler u. Fukuhara bekannt geworden. Später wurde noch einmal ausführlich von Gins auf Adsorptionsverluste hingewiesen. Aus folgendem Beispiel geht hervor, welche Einbuße eine Pockenvirus-haltige Flüssigkeit durch Kontakt mit Kieselgur erleiden kann.

Versuch: 0,4 g Kieselgur, geglüht, plus 20 ccm Pockenhirnemulsion 1:100 werden 5 Min. im Erlenmeyer-Kolben geschüttelt, durch einfaches Filtrierpapier filtriert. Das Filtrat ist fast klar. 0,15 ccm werden korneal auf ein Kaninchen verimpft. Gleichzeitig wird die rechte Cornea als Kontrolle mit der nur durch Filtrierpapier (ohne Kieselgur) filtrierten Pockenhirnemulsion geimpft. Der Paulsche Versuch ergibt nach 48 Std. an der linken Cornea 0!, an der rechten etwa 40 Herde.

Ein solches Ergebnis läßt es fast fraglich erscheinen, ob sich bei einwandfrei bakteriendichten Kieselgurkerzen Pockenvirus aus Hirnmaterial zum Durchlaufen bringen lassen wird. Zum mindesten wird man sagen können, daß zur Gewinnung von Pockenfiltraten kaum ein ungeeigneteres Filtermaterial als Kieselgur zur Anwendung gelangen kann. Anfänglich hoffte ich durch einen Kunstgriff, der weder bei den oben beschriebenen noch bei den bisher in der Literatur veröffentlichten Pockenfiltrationsarbeiten zur Anwendung gekommen ist, die starke Adsorptionskraft des Kieselgurs herabsetzen zu können. Es genügt nämlich, zu einem pockenhaltigen Kieselguradsorbat Ammoniak hinzuzusetzen und zu schütteln, um etwa 25 Proz. des Virus von dem Kieselgur wieder abzulösen, während es bei neutraler oder schwach saurer Reaktion recht fest adsorbiert bleibt.

Versuch: Mehrfach gefrorenes und aufgetautes pockenhaltiges Hirnmaterial wird 1:60 mit 0,85proz. Kochsalzlösung verdünnt (= Lösung a), 20 ccm mit 0,4 g Kieselgur 5 Min. geschüttelt, 5 Min. mit 3000 Touren zentrifugiert (überstehende Flüssigkeit = Lösung b). Kieselgur 2mal mit 20 ccm 0,85proz. NaCl-Lösung gewaschen und je 5 Min. mit 3000 Touren ausgeschleudert. (Letzter Zentrifugenklar = Lösung c.) Kieselgur mit 20 ccm $n/_{50}$ NH_3 20 Min. geschüttelt, 5 Min. mit 3000 Touren ausgeschleudert (Zentrifugenklar = Lösung d). Von Lösung a bis d werden je 0,15 ccm auf die Kaninchencornea verimpft.

Kan.	85	rechts	Lösung	a,	nach	48	Std.	im	Paulschen	Versuch	mehr als 50 Herde
„	85	links	„	b,	„	48	„	„	„	„	3 „
„	86	rechts	„	c,	„	48	„	„	„	„	3 „
„	86	links	„	d,	„	48	„	„	„	„	15 „

Oder in einem zweiten Versuch:

1) **Kaninchen 425: 0,15 ccm Zentrifugenklar von NaCl-Lösung des Kieselguradsorbates;**

2) **Kaninchen 427: 0,15 ccm Zentrifugenklar der ammoniakalischen Kieselgurelution;**

3) **Kaninchen 428: 0,15 ccm Zentrifugenklar von Lapinekontrolle ohne Kieselgur.**

Kan.	425	nach	3	Tagen	im	Paulschen	Versuch	rechts	0,	links	1	Herd
„	427	„	3	„	„	„	„	„	3,	„	5	Herde
„	428	„	3	„	„	„	„	„	14,	„	16	„

In einem dritten Versuch ergab die NaCl-Lösung des Kieselguradsorbates wieder 0 bzw. 1 Herd, die ammoniakalische Elution 4 bzw. 5, die kieselgurfreie Neurolapine-Kochsalzkontrolle 15 bzw. 20 Herde für die rechte bzw. linke Cornea. Da bei den zwei Waschungen des Kieselgurs gewöhnlich geringe Virusmengen verloren gehen, so ist die Ablösungs- (Elutions-)Ausbeute durch NH_3 theoretisch etwas besser als 25 Proz.

Man konnte also hoffen, durch Ammoniakalisierung eines Pocken-Neurolapinefiltrans die Adsorbierbarkeit des Virus herabzusetzen und so auch für die Filtration — wie es bei den d'Herelle-Lysinen Gildemeister und Herzberg gezeigt haben — zu einem besseren Resultat zu kommen. Auffälligerweise ist, wie mehrere Versuche gezeigt haben, das Versuchsergebnis schlechter, wenn man sofort im alkalischen Medium adsorbieren läßt und nicht erst wie im obigen Versuch der ersten reinen Neurolapine-Kochsalzlösungsadsorption einige Waschungen mit Kochsalzlösungen folgen läßt. Fügt man zu einer Kieselguraufschwemmung ammoniakalisiertes Pockenvirus, so wird auch dieses nahezu völlig adsorbiert, und die Herdbildung auf der Cornea entspricht den Zahlen,

die für den Zentrifugenklar des Kieselguradsorbates in Kochsalzlösung gefunden werden.

Versuch:

Suspension A. 5 ccm verdünnte Neurolapine; 5 ccm 0,85 Proz. NaCl; 0,2 g Kieselgur
„ B. 5 „ „ „ ; 5 „ $n/_{25}$ NH_3; 0,2 g „
„ C. 5 „ „ „ ; 5 „ 0,85 Proz. NaCl; 0 g „

Die 3 Suspensionen werden 5 Min. in 100 ccm Erlenmeyer-Kölbchen geschüttelt, sodann 5 Min. bei 3000 Touren zentrifugiert.

0,15 ccm Zentrifugenklar A korneal auf Kan. 389; nach 3 Tagen r. 1, l. 0 Herde
0,15 „ „ B „ „ „ 390; „ 3 „ „ 2, „ 0 „
0,15 „ „ C „ „ „ 391; „ 3 „ „ 20, „ 25 „

Die Ammoniakalisierung des pockenhaltigen Neurolapinematerials dürfte daher für die Filtration kaum Vorteile erwarten lassen. Für die durch die Kieselgurwaschungen bedingte Differenz fehlt mir vorläufig eine Erklärung. Würde es sich um Fermente oder ähnliche Substanzen handeln, so wäre es nicht schwer, sie zu geben, da hier die mit der Zahl der Auswaschungen geringer werdende Adsorbierbarkeit eine bekannte Erscheinung ist, welche man auf die Ausschaltung der Koadsorbentien bezieht.

IV. Pocken-Neurolapine als Impfmaterial.

Die Gewinnung von bakteriell sterilem Pockenpassageimpfstoff, wie er bei den intrazerebralen Kaninchenimpfungen erhalten wird, läßt an seine Verwendung als Impfstoff beim Menschen denken. Levaditi hat die ersten Versuche in dieser Richtung ausführen lassen und folgendes Ergebnis erzielt: bei 12 Neugeborenen 66 Proz. Impferfolge; bei 37 Säuglingen unter 1 Jahr 71 Proz. Impferfolge; bei 40 Erwachsenen 50 Proz. Impferfolge. Die Zahlen sind also sehr klein. Sie werden ergänzt durch die Untersuchungen von Jancou, der bei 30 Neugeborenen 70 Proz. und bei 289 Erwachsenen 37 Proz. Impferfolge hatte. Die Art der Pustelbildung und der Ablauf der Erscheinungen entsprachen den bei der Kälberlymphe üblichen Reaktionen. Komplikationen (Oedem, Entzündung) sollen nur bei überempfindlichen Personen vorkommen. Levaditi und Jancou sprechen sich auf Grund der absoluten Reinheit der Pocken-Neurolapine, ihrer konstanten Virulenz und Haltbarkeit günstig betr. ihrer Verwendung als Impfmaterial aus.

Fast gleichzeitig und unabhängig von Levaditi hat Krumbach Pocken-Neurolapine hergestellt. Untersuchungen am Menschen führte er nicht aus; er glaubt aber auf Grund der guten Impferfolge am Kaninchen und der von Voigt betonten Parallelität der Impfintensität an der Menschen- und Kaninchenhaut ebenfalls die Anwendung der Pocken-Neurolapine oder besser eines analog gewonnenen Kälberhirnimpfstoffes vorschlagen zu können. Als Material für seine Impfungen benutzte Krumbach Trockenimpfstoff, den er durch Eintrocknen der Pocken-Neurolapine an Glasplatten im Exsikkator gewonnen hatte. Dieser Impfstoff blieb mindestens $1^1/_2$ Monate gut virulent und vertrug auch 14tägige Aufbewahrung in 37° warmer Luft, wodurch seine Verwendbarkeit in den Tropen möglich erscheint.

Aus den Zahlen von Levaditi und Jancou geht hervor, daß der Kaninchenhirnimpfstoff an dermotroper Virulenz der gewöhnlichen

Kälberlymphe nachsteht. Die Anwendbarkeit der Pocken-Neurolapine für Impfzwecke scheint daher schon aus diesem Grunde nicht empfehlenswert, denn man wird einen Impfstoff, der bei Erwachsenen einen Ausfall von mehr als 50 Proz., bei Säuglingen von 30 Proz. ergibt, nicht empfehlen können. Ein zweiter Grund kommt hinzu, eine Einführung der Pocken-Neurolapine zurzeit abzulehnen. Durch die Untersuchungen über die Encephalitis epidemica ist man bei Kaninchen und anderen Laboratoriumstieren auf das Vorkommen von Erregern (Encephalitozoon cuniculi) aufmerksam geworden, die enzephalitische Prozesse im Kaninchenhirn auslösen (Olivier, Twort, Thalimer, Doerr u. Zdansky, Levaditi u. a.). Es ist zu fragen, ob dieses von Levaditi den Protozoen zugerechnete Encephalitozoon cuniculi für den Menschen apathogen ist, oder ob es auch bei ihm encephalitische Krankheitserscheinungen hervorrufen kann. Bisher ist hierüber nichts bekannt; es ist auch unwahrscheinlich, daß z. B. für die in letzter Zeit mehrfach (Kraus, Schweinburg) erörterten Lähmungen im Gefolge der Injektion von Virus fixe (Kaninchenhirn-Rückenmarkmaterial) das Encephalitozoon anzuschuldigen ist. Pathologisch-anatomischer Befund und klinischer Verlauf der durch Einspritzung von normalem Kaninchenhirn bei Kaninchen erzielbaren Erkrankungen (Schweinburg) ist von den Erscheinungen der Encephalitozoon-Encephalitis durchaus verschieden. Die Möglichkeit einer auch für das Menschenhirn pathogenen Wirkung des Encephalitozoon cunic. wird hierdurch aber nicht ausgeschaltet und muß in die Betrachtung einbezogen bleiben. Da die Frage, ob das Encephalitozoon cuniculi bei Menschen chronisch-encephalitische Veränderungen, die — wie beim Kaninchen — klinisch nicht besonders in Erscheinung zu treten brauchen, hervorrufen kann, experimentell kaum zu lösen ist, muß versucht werden, mit Encephalitozoon behaftete Tiere bei jedweder Hirnimpfstoffbereitung auszuschalten. Auf Grund der Arbeiten von Plaut, Mulzer und Neubürger scheint die Liquoruntersuchung, welche nach Plaut jede Art von encephalitischen Prozessen aufdeckt, geeignet, auch diese Veränderungen anzuzeigen. In diesem Falle muß gefordert werden, daß der Liquor aller irgendwie zur Herstellung von Hirn-Rückenmarkimpfmaterial benutzten Kaninchen (Wut) vor der Infektion der Tiere untersucht wird, und daß die auf Grund ihres Liquors nicht als normal befundenen Kaninchen nicht zur Impfung benutzt werden dürfen. Dann wäre man wahrscheinlich auch wieder in der Lage, von einem bakteriologisch einwandfreien Hirnimpfstoffmaterial zu sprechen. Heute ist man wegen des Vorkommens des (glyzerinkonservierbaren) Encephalitozoon cuniculi trotz bakteriologisch negativen Befundes nicht berechtigt, jeden Kaninchenhirnimpfstoff ohne weiteres als steril zu bezeichnen. Dieser Umstand bedeutet eine weitere Beeinträchtigung der an sich ansprechenden Methode der Pockenimpfstoffgewinnung durch intrazerebrale Kaninchenimpfung.

Man könnte schließlich noch Bedenken haben, ob nicht die Steigerung der Neurotropie des Pockenvirus durch die Passage im Hirngewebe (siehe die Verkürzung des Krankheitsverlaufes bis zum Exitus in den Passageversuchen Levaditis) eine Gefahr für die Impfung am Menschen einschließt. Denn Levaditi glaubt, daß die größere Hirnvirulenz der Pocken-Neurolapine gegenüber der Dermovakzine durch eine Anpassung des Erregers an das Gehirn bedingt sei, derart, daß dieser eine neue Eigenschaft gegenüber dem Gehirn erworben habe. Kompli-

kationen mit dem Nervensystem, die zum Exitus führten, sind aber von Levaditi beim Kaninchen weder bei kutaner noch bei intravenöser Injektion beobachtet worden, sofern nicht eine direkte Läsion des Gehirns vorgenommen wurde. Bei intratestikulärer Pocken-Neurolapineimpfung tritt dagegen häufig der Exitus unter typischen Hirnerscheinungen, wie bei intrazerebraler Impfung, ein. Dieses letzte Versuchsergebnis gibt wohl Burnet u. Conseil Anlaß, Bedenken gegen die Verwendung von Pocken-Neurolapine als Impfmaterial zu erheben, da sie davon sprechen, daß man nicht wissen könne, ob ein so stark auf das Nervensystem abgestimmtes Pockenvirus wie die Neurolapine nicht Hirnerscheinungen beim Menschen hervorrufen könne. Außerdem sei hier angeführt, daß Burnet u. Conseil auch aus klinischen Erfahrungen eine Anwendung der Pocken-Neurolapine ablehnen, da sie sowohl anormale Pustelbildung (Nekrose) als auch sekundäre Eruptionen beobachtet haben.

Zu der Auffassung Levaditis bezüglich der Virulenzabhängigkeit vom „Terrain" ist zu bemerken, daß wohl nicht ausschließlich die Beziehung besteht:

Haut (bzw. Cornea)-Passage = Steigerung der dermotropen Qualität,
Hirn-Passage = Steigerung der neurotropen Qualität,

denn durch die Untersuchungen von Gildemeister und Herzberg am Virus des Herpes febrilis ist gezeigt worden, daß ein ursprünglich für Kaninchen nicht neurotropes Herpesvirus durch Passage auf der Haut (Meerschweinchenpfote) so virulent gemacht werden kann, daß es Kaninchen nunmehr bei cornealer Impfung tötet. Das Hirnpassagematerial derjenigen Vira, die zum Zentralnervensystem Beziehung haben, darf also nicht ohne weiteres als gefährlicher angesehen werden als das Passagematerial, das vom Integumentsystem gewonnen wurde. Auch auf diesem können, wie aus dem soeben angeführten Versuchsergebnis hervorgeht, Virulenzsteigerungen für die heterologe Komponente eintreten. Es bleiben aber die schwächere kutane Wirksamkeit, die Unbekanntheit der pathogenen Wirkung des Encephalitozoon cuniculi (und event. weiterer Erreger spontaner Kaninchenencephalitiden) sowie die in einzelnen Fällen (Burnet u. Conseil) beobachteten anormalen Pustelbildungen und Sekundäreruptionen als Grund, sich über die Zulässigkeit der Pocken-Neurolapine im Vergleich zur Kälberlymphe auseinanderzusetzen. Ehe diese angeführten Bedenken nicht widerlegt sind, erscheint es wirtschaftlich unratsam und klinisch bedenklich, von der bisherigen Methode der Impfung mit Kälberlymphe abzugehen.

Zusammenfassung.

1. a) Die Ergebnisse von Levaditi, Nicolau u. Harvier bezüglich der Passagezüchtung des Pockenvirus im Kaninchenhirn (Pocken-Neurolapine) sowie die von diesen Autoren gemachten Angaben über die Verteilung des Pockenvirus im Kaninchenkörper werden bestätigt.

b) Man erhält die von Levaditi angegebene Pockenvirusverteilung im Kaninchenorganismus nicht nur nach der von Levaditi angewendeten intravenösen, sondern auch bei der intrazerebralen Impfung.

c) Die früher mehrfach erörterte und verneinend beantwortete Frage, ob der Pockenerreger im Blute der Kaninchen kreise, ist jetzt

dahin entschieden, daß zwar ein Zirkulieren des Virus wie bei septikämischen Erkrankungen nicht nachzuweisen ist, daß es aber bei intrazerebraler, intratestikulärer und intravenöser Injektion zu einer Infektion des Kaninchenkörpers kommt, die hauptsächlich Organe des äußeren Keimblattes betrifft und die von einer tödlich verlaufenden Encephalitis vaccinica gefolgt sein kann.

2. Ausschleuderungs-, Adsorptions- und Filtrationsversuche mit Pocken-Neurolapine ergaben,

a) daß selbst nach $1^1/_2$ Std. währendem Zentrifugieren bei 3000 bis 3500 Touren beträchtliche Virusmengen im Zentrifugenklar bleiben;

b) daß, wie in den Vakzineversuchen von Gins sowie Kraus, v. Eisler u. Fukuhara auch Pocken-Neurolapine sehr stark adsorbierbar ist. Aus Kieselgur-Pockenadsorbaten läßt sich das Virus durch Ammoniak etwa zu 25 Proz. auswaschen. Hierbei wird eine eigenartige Differenz in der Eluierbarkeit gefunden, je nachdem Waschungen mit gewöhnlicher Kochsalzlösung eingeschaltet wurden oder nicht.

c) Die starke Adsorptionskraft des Kieselgurs deckt auf, daß zur Pockenfiltration kaum ungeeignetere Filterkerzen verwendet werden können als solche aus Kieselgur. Dementsprechend ergab sich, daß selbst nach reichlicher Mazeration des Hirns Pocken-Neurolapine trotz hoher Virulenz in keinem Falle durch Berkefeld-V-Kerzen zum Durchlaufen gebracht werden konnte.

3. Die Einführung der Neurolapine als Pockenimpfstoff an Stelle der üblichen Vakzine wird abgelehnt, solange nicht höhere Impferfolge beim Menschen erzielt werden können, anormale Pustelbildung und Sekundäreruptionen ausbleiben, und solange nicht die Bedeutung der durch Mikrosporidien bedingten Encephalitis des Kaninchens für den Menschen klargestellt ist.

4) Wenn die Kaninchenliquoruntersuchung nach Plaut jeden Fall von Encephalitis beim Kaninchen anzeigt, also auch die Encephalitozoon-Encephalitis, dann ist zu fordern, daß alle zur Hirnimpfstoffbereitung (Wut) vorgesehenen Kaninchen vor der Impfung auf normalen Liquorbefund untersucht und Tiere mit pathologischem Liquor ausgeschaltet werden.

Literatur.

Biglieri, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 91. 1924. p. 323. — Borrel, Ann. Inst. Past. T. 17. 1903. p. 99. — Ders., Bull. Inst. Past. T. 5. 1907. p. 497. — Burnet, Ann. Inst. Past. T. 20. 1906. p. 742. — Burnet et Conseil, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 90. 1924. p. 1408. — Calmette et Guérin, Ann. Inst. Past. T. 15. 1901. p. 161. — Camus, Journ. de Physiol. et de Pathol. T. 17. p. 244. 1917 u. 18. — Gildemeister u. Herzberg, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. 1924. S. 228. — Dies., Deutsch. med. Woch. 1925. S. 97. — Gins, Berl. klin. Woch. 1914. S. 391. — Gins u. Krause, Ztschr. f. Hyg. Bd. 100. 1923. S. 155. — Gins u. Weber, Ibid. Bd. 82. 1916. S. 143. — Henseval, Bull. l'Acad. Roy. de Méd. Belg. 1910. — Jancou, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 86. 1922. S. 910. — Jürgens, Charité-Annal. 1905. S. 136. — Kraus, Wien. klin. Woch. 1924. S. 661. — Kraus, v. Eisler u. Fukuhara, Ztschr. f. Immunf. 1. 1909. S. 307. — Krumbach, Ibid. Bd. 38. 1923. S. 1. — Levaditi

u. Nicolau, Ann. Inst. Past. T. 37. 1923. p. 1. — Lipschütz, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 46. 1908. S. 620. — Ders., Wien. klin. Woch. 1922. S. 545. — Marie, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 83. 1920. p. 476. — Menze, Münch. med. Woch. 1920. S. 1111. — Mühlens u. Hartmann, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 41. S. 52. — Nodake, Ztschr. f. Immunforsch. Bd. 41. 1924. S. 52. — Noguchi, Journ. Exper. Med. Vol. 21. 1915. p. 539. — Paschen, in Kraus-Levaditi, Handbuch der Technik etc. 1. Erg.-Bd. 1911. S. 486. — Prowazek, Arb. K.G.A. Bd. 23. 1906. S. 534. — Prowazek u. Yamamoto, Ibid. Bd. 26. 1907. S. 54. — Prowazek, Münch. med. Woch. 1909. S. 2627. — Plaut, Mulzer u. Neubürger, Ibid. 1924. S. 1781. — Rona u. Mislowitzer, Biochem. Ztschr. 1924. Bd. 146. S. 1. — Schweinburg, Wien. klin. Woch. 1924. S. 797 u. 1093. — Süpfle, Arch. f. Hyg. Bd. 68. 1908. S. 237. — Uhlenhuth u. Bieber, Ztschr. f. Immunforsch. Bd. 35. 1923. S. 311. — Watanabe, Arch. f. Hyg. Bd. 92. 1924. S. 359. — v. Wasielewski, Münch. med. Woch. 1905. S. 1189.

Nachdruck verboten.

Die Wirkung des Radiums auf die Kuhpockenlymphe.

Vorläufige Mitteilung.

[Allgemeines Pathologisches Institut der königl. Universität Bologna (Prof. G. Tizzoni).]

Von Dr. **Umberto Poppi.**

Die Nachforschungen, von denen in dieser Abhandlung die Rede ist, wurden mit einem Radiumpräparat, enthaltend 0,1 g Radiumbromid, ausgeführt. Das Präparat war, in einem Behälter nach englischer Methode eingeschlossen, in einem Gesamtwerte von 5 000 000 UR., Eigentum der königl. Universität Bologna. Die Kuhpockenlymphe, welche für die Tierversuche diente, war extra vom Serotherapeutischen Institut in Bern geliefert, diejenige für die Proben an Menschen vom Städtischen Hygienischen Institut zu Bologna abgetreten worden. Die erwähnte Lymphe war zur Zeit, wo sie zur Impfung bei Kindern dienen sollte, der Wirkung des Radiums, in den üblichen Glasphiolen verschlossen mit handelsüblichen paraffinierten Korkstopfen ausgesetzt; die für die Tierversuche verwendete war der Einwirkung des Radiums, gelöst oder ungelöst in einer physiologischen Lösung 1:10, in kleinen sterilisierten Alluminiumgefäßen, die mit ihrem unteren Ende auf die dünne Glimmerplatte aufgelegt wurde, welche als Verschluß der englischen Radiumkapsel dient, unterworfen. In jedem Falle wurde die Kuhpockenlymphe in einem Eisbehälter unter 10° C gehalten.

Als Versuchstier wurde ein Kaninchen gewählt, das die größte Empfindlichkeit für die Kuhpockenlymphe hat und den geringsten individuellen Schwankungen der Einwirkung der Kuhpockenlymphe unterworfen ist; die Einimpfung erfolgte einmal nach der üblichen Methode auf der Haut, einmal in den Hoden und einmal in die Hornhaut. Solche Versuche wurden zur Lösung folgender wissenschaftlicher Fragen angestellt:

1) Ob das Radium die Kraft besitzt, die Kuhpockenlymphe von den saprophytischen Bakterien zu reinigen, und im bejahenden Falle, in welcher Zeit? — 2) Ob in Anbetracht der Abtötung der saprophytischen Bakterien die Kuhpockenlymphe ihre Wirksamkeit bewahrt und

für welche Zeit? — 3) Ob solche der Wirksamkeit resp. der Bestrahlung ausgesetzte Kuhpockenlymphe eine Schwächung erfährt? — 4) Ob bei der Kuhpockenimpfung mit Kuhpockenlymphe, die der Bestrahlung des Radiums ausgesetzt und mehr oder weniger geschwächt war, es gelingt, dem Menschen und den Tieren eine gute Immunität zu verleihen?

Die in dieser Hinsicht erzielten Resultate können in der Reihenfolge der oben gestellten Fragen wie folgt zusammengefaßt werden:

1) Das Radium reinigt die Kuhpockenlymphe, gelöst mit wässeriger Glyzerinlösung, von den Bakterien, welche sie im allgemeinen verunreinigen. Diese Tatsache ist vollkommen und konstant, wenn die Expositionsdauer der Bestrahlung mittels des angewendeten Radiumpräparates 96 Std. beträgt.

2) Während die Reinigung der Kuhpockenlymphe mittels Radiumbestrahlung von 96 Std. vollkommen ist, bleibt ihre spezifische Wirksamkeit fast ganz und gar bewahrt. In diesem Falle beginnen sich kaum die ersten Symptome der Schwächung zu zeigen, wenn die Impfung der durch Bestrahlung geschwächten Lymphe auf der Haut erfolgt.

3) Nur mit einer längeren Expositionsdauer bewirkt das Radium auf die Kuhpockenlymphe eine ausgesprochene Schwächung, welche im übrigen sehr verschieden von den einzelnen empfindlichen Geweben empfunden wird. So machen sich die Wirkungen einer sehr bemerkbaren Schwächung auf den Hoden nach 24- und 48stündiger Bestrahlung auf der Haut nach 144 Std. und auf der Hornhaut in der gleichen Zeit wie auf der Haut bemerkbar, aber bei Gleichheit der Versuchsbedingungen zeigt sich die örtliche Reaktion immer in einem höheren Grade. Z. B. erweist sich nach 96 Std. Bestrahlung, wenn die Einimpfung der Lymphe auf die Haut schon in diesem Teile den 1. Grad der Schwächung zeigt, die auf die Hornhaut vorgenommene Impfung mit der gleichen bestrahlten Lymphe als unverändert und von gleich wirkender Heftigkeit wie bei den Kontrollversuchen.

Man kann daher sagen, daß die Schwächung der Kuhpockenlymphe zuerst von dem Hoden, dann von der Haut und endlich von der Hornhaut empfunden wird. Man würde daher auf Grund dieser Experimente anzunehmen haben, daß der Hoden am wenigsten empfindlich gegen die Kuhpockenlymphe ist; dann folgte die Haut und als letztes die Hornhaut, die von allen erprobten Geweben als am empfindlichsten anzusprechen ist.

4) Die bestrahlte Kuhpockenlymphe, sowohl eingeimpft auf die Haut, wie auch in den Hoden injiziert, ist trotz ihrer Schwächung weiterhin imstande, eine gute Immunität sowohl bei Menschen wie auch bei Tieren zu verleihen, und zwar 74 Tage nach der Pockenimpfung. Die Versuche, die ich bei Kindern ausgeführt habe (4 Fälle, umfassend 12 Impfungen) waren aus von meinem Willen unabhängigen Ursachen sehr beschränkt; sie wurden alle mit einer Kuhpockenlymphe ausgeführt, die dem Radium nach der 1. Anordnung ausgesetzt wurde, die weniger vollständig und sicher ist.

Demnach können die bisher erhaltenen positiven Ergebnisse, so vielversprechend sie waren, in bezug auf den Menschen noch nicht als abschließende betrachtet werden. Nicht weniger nützlich ist es, daran zu erinnern, immer in bezug auf die abgeschwächte Kuhpockenlymphe, daß auf der mit bestrahlter Lymphe geimpften Hornhaut sich immer die

verstreuten Guarnierischen Körperchen verbinden und durch Nichts sich von den kontrollierten unterscheiden, sei es in Zahl und Größe, sei es im Aussehen und Färbung, auch wenn dieselbe Lymphe bei Tieren die Anzeichen einer fortgeschrittenen Schwächung aufwies.

Niemand kann sich der Neuheit und Wichtigkeit dieser Ergebnisse verschließen, sowohl von wissenschaftlicher wie auch von praktischer Seite aus. Bekanntlich ist man seit vielen Jahren sehr stark damit beschäftigt, das Problem der Reinigung der Lymphe mit den verschiedensten Mitteln, besonders chemischen, zu ergründen und zu erforschen, ohne daß es aber bisher gelungen ist, in dieser Beziehung wirklich völlig ausreichende Ergebnisse zu erzielen. (Vergleiche in diesem Zusammenhang die jüngste Arbeit von Prof. Kirstein „Ueber die Keimfreiheit und Virulenz der Schutzpockenlymphe" (Ztschr. f. Hyg. Bd. 103. 1924. S. 584).

Jetzt aber gelingt es vollkommen, durch die dem Radium 96 Std. lang ausgesetzte Lymphe ein bakteriologisch steriles Produkt zu erhalten unter Wahrung seiner spezifischen Eigenschaften, und sowohl bei der Einwirkung auf die Haut und in höherem Grade noch auf die Hornhaut des Kaninchens eine Pockenreaktion zu erzielen, die derjenigen der Kontrolle gleich ist. Auf jeden Fall würde es genügen, wenn man der reinen Lymphe alle ihre ursprüngliche Wirksamkeit zurückgeben wollte, sie in Serien auf das Tier mit den nötigen antiseptischen Vorsichtsmaßnahmen zu übertragen, wie man es bei der Gewinnung der Neurovakzine macht.

Jene gereinigte Schutzpockenlymphe behält auch dann ihre immunisierende Wirkung, wenn sie durch die sofortige Einwirkung des Radiums einen gewissen Grad von Schwächung besitzt, und erfüllt alle notwendigen Voraussetzungen für die freie Anwendung in der Praxis.

Endlich eröffnen diese Erfolge den Weg, um bei anderen Infektionen mit einem sehr vereinfachten Verfahren die unreinen Stoffe eines filtrierbaren Virus im reinen Zustand zu erhalten, so wie im vorliegenden Falle kann man auch in Zukunft in allen ähnlichen Fällen leicht sehr wertvolles Material durch die entsprechenden Forschungen über die Natur dieses Virus und seine Rolle als wirksamer Faktor in Krankheit und zum Studium ihrer biologischen Eigenschaften erhalten.

Aehnliche Untersuchungen wie ich hatte nur Sereni (Poliklinik. Med. Abt. 1908) angestellt, aber mit einem sehr schwachen Radiumpräparat (0,005 g Radiumbromid), deren Ergebnisse ausschließlich durch Impfung mit bestrahlter Lymphe bei Kindern erhalten worden sind. Auf Grund seiner Ergebnisse leugnet er aber jede Wirkung des Radiums auf das Pockenvakzin, die weder der Zerstörung noch der Schwächung in irgendeiner ihrer Wirkungen unterworfen sei; es sei nur eine geringe örtliche und allgemeine Reaktion nach der Impfung bei Kindern mit der bestrahlten Lymphe nach 164 Std. beobachtet worden, und zwar in unregelmäßiger Weise während der Dauer von 8 Tagen. Demgemäß hat Sereni, anstatt auf einen Beginn von Schwächung zu schließen, es irrigerweise als Erfolg einer reinigenden Wirksamkeit durch das Radium auf die vorhandene saprophytischen Bakterien ausgelegt, ohne aber eine Erklärung für die entgegengesetzten bakteriologischen Nachforschungen gefunden zu haben.

Ich dagegen konnte aber beobachten, wie oben ausgeführt, wobei ich ausschließen kann, daß die gereinigte Kuhpockenlymphe, welche nicht gleichzeitig einen bedeutenden Grad von Schwächung erfahren

hat, tatsächlich eine geringere örtliche und allgemeine Reaktion hervorruft. Tatsächlich erfolgt noch eine starke Reaktion der Haut und in verstärktem Maße der mit 96 Std. bestrahlter Lymphe geimpften Hornhaut, wobei die Kuhpockenlymphe vollständig von den darin enthaltenen saprophytischen Bakterien gereinigt wird, wie unzweifelhaft durch die negativen Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen bestätigt worden ist.

Bologna, Dezember 1924.

Nachdruck verboten.

Verzeichnis der Cylicostomum-Arten der Equiden, mit Bemerkungen über einzelne Spezies.

[Zoologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Utrecht.]

Von **J. E. W. Ihle.**

Mit 4 Abbildungen im Text.

1924 veröffentlichte ich einen kurzen Aufsatz in niederländischer Sprache, in welchem ich, wie in früheren Jahren (1921, 1922), das Beibehalten des Gattungsnamens Cylicostomum befürwortete. Dagegen haben Railliet (1923), Yorke and Macfie (1923. p. 439) und P. L. le Roux (1924) statt des Namens Cylicostomum Railliet den Namen Trichonema angewendet, welchen Cobbold (1874) einer Larve von Cylicostomum des 4. Stadiums gegeben hat.

Nach dem Prioritätsgesetz haben diese Autoren durchaus recht. Ich ziehe es aber doch vor, den allgemein benutzten Namen Cylicostomum beizubehalten, da es nicht ausgeschlossen ist, daß dieser Name infolge von Beschlüssen künftiger internationaler zoologischer Kongresse mit vielen anderen Gattungsnamen gegen die Angriffe des Prioritätsgesetzes geschützt werden wird. Außerdem ist der Name Trichonema außerhalb der helminthologischen Kreise noch fast völlig unbekannt, der Name Cylicostomum aber seit 1901 allgemein in Gebrauch.

Die Nomenklatur ist nun in dieser Gattung besonders verwickelt, da Railliet und le Roux sehr verschiedener Ansicht sind über die Frage, welche Art dieser Gattung als die typische zu betrachten ist, und diese Ansicht die Nomenklatur der Untergattungen beeinflußt, welche ich 1922 unterschieden habe. So glaubt Railliet (1923), daß der von Mehlis (1831) kurz beschriebene Strongylus tetracanthus dieselbe Art ist, welche von Boulenger (1917) Cylicostomum insigne genannt worden ist. Wenn dies richtig wäre, müßte letztgenannte Art Trichonema tetracanthum (Mehlis) heißen, und die Art, welche von Looss als C. tetracanthum beschrieben ist, wird von Railliet T. aegyptiacum genannt. C. insigne stellte ich in die Untergattung Cylicocylus, welche nach Railliet Trichonema heißen muß, da sie den Typus der Gattung (T. tetracanthum) umfaßt, während meine Untergattung Cylicostomum einen neuen Namen bekommen müßte. Also ist nach Railliet: Cylicostomum (Cylicocyclus) insigne (Boulenger) = Trichonema

(Trichonema) tetracanthum (Mehlis) und Looss' Cylicostomum (Cylicostomum) tetracanthum (Mehlis) = Trichonema (.....) aegyptiacum Railliet.

Le Roux (1924. p. 117) ist nun aber ganz anderer Ansicht: Er betrachtet C. longibursatum Yorke et Macfie als die typische Art der Gattung, da O. F. Müller 1780 ein ♂ dieser Art abgebildet hat, und diese weit verbreitete Art in le Roux' Material die häufigste war. Nach ihm muß also die Untergattung Cylicostephanus, zu welcher C. longibursatum gehört, Trichonema heißen, während er Mehlis' S. tetracanthus als nomen nudum betrachtet. Für das Loosssche C. tetracanthum nimmt er Railliets Namen T. aegyptiacum, für welche Art er den Untergattungsnamen Cylicostomum beibehält. Also ist nach le Roux: Cylicostomum (Cylicocyclus) insigne (Boulenger) = Trichonema (Cylicocyclus) insigne (Boulenger), Cylicostomum (Cylicostephanus) longibursatum Yorke et Macfie = Trichonema (Trichonema) longibursatum (Yorke et Macfie) und Looss' Cylicostomum (Cylicostomum) tetracanthum (Mehlis) = Trichonema (Cylicostomum) aegyptiacum Railliet.

Wir haben hier ein schönes Beispiel vor uns von der Unzulänglichkeit der jetzt gültigen Nomenklaturregeln, denn es zeigt, wie die subjektive Ansicht der Forscher überwiegt, und wie 2 Forscher, welche beide glauben, streng an den Regeln festhalten zu müssen, zu völlig entgegengesetzten Ansichten kommen, so daß durch die Anwendung der Regeln nicht nur keine Einigkeit erreicht, sondern die größte Verwirrung gestiftet wird.

Ich bedaure es sehr, daß weder Railliet noch le Roux sich der Nomenklatur haben anschließen können, welcher ich in meiner zusammenfassenden Uebersicht (1922) der Cylicostomum-Arten gefolgt bin.

Nach wie vor glaube ich, daß Looss nicht den Nomenklaturregeln zuwider handelte, als er den Artnamen C. tetracanthum, welchen wir mit le Roux als nomen nudum bezeichnen dürfen, auf die von ihm in Aegypten am häufigsten gefundene Art anwendete, so daß diese Art der Typus der Gattung bleiben kann und Railliets neuer Name für diese Art (aegyptiacum) überflüssig wird. Meiner Ansicht nach besteht kein einziger zwingender Grund, um mit le Roux statt C. tetracanthum C. longibursatum als Typus zu bezeichnen. Ich glaube also berechtigt zu sein, nicht von der von mir 1922 benutzten Nomenklatur abzuweichen.

Da nun seit dem Erscheinen meiner Zusammenfassung 1922 wieder mehrere neue Arten beschrieben sind, lasse ich hier eine Liste der jetzt bekannten Arten der Gattung Cylicostomum folgen. Bemerkungen über einige dieser Arten und die Beschreibung einer neuen Art schließe ich hierbei an:

Subgenus 1. Cylicostomum Ihle.

1. C. tetracanthum (Mehlis) = T. aegyptiacum Railliet. Diese Spezies ist außer in Aegypten auch in England, Ungarn, Indien und Südafrika gefunden. Sie kommt an 1. Stelle beim Esel vor (le Roux 1924. p. 119).

2. C. labratum (Looss).

3. C. ornatum Kotlán (cf. Theiler 1923. p. 35. pl. VII).

Diese Art wurde von Kotlán in Ungarn gefunden und auch von le Roux in England und von Miss Cram in N.-Amerika wahrgenommen. Fräulein Theiler gibt Abbildungen nach Kotlán. Sie bemerkt (p. 36), daß Kotlán zwar sagt, daß die Mundkapsel nach dem Typus derjenigen von C. labratum gebaut ist, aber nicht „the extra chitinous supports of the external leaf-crown" (= Looss' problematic structure; Ihle 1922. p. 8) abbildet. Sie meint, daß C. ornatum nach Kotláns Zeichnung eher in die alveatum-catinatum-Gruppe (Subgenus Cylicocercus) gehöre. Auf Grund der Angaben Kotláns aber lasse ich C. ornatum in der Untergattung Cylicostomum. Ich bemerke, daß in der von Fräulein Theiler veröffentlichten Zeichnung Kotláns die Elemente der inneren Blätterkrone im optischen Durchschnitt als Stiftchen gezeichnet sind, während Kotlán sie als Plättchen beschreibt, wie diese in der Untergattung Cylicostomum vorkommen.

4. C. labiatum (Looss).

4a. C. labiatum var. digitatum Ihle.

Diese Varietät unterscheidet sich vom Typus durch den Besitz von gut entwickelten fingerförmigen Fortsätzen am Genitalconus. Le Roux (1924. p. 125) und Fräulein Theiler (1923. p. 21) erkennen keine Varietäten an, welche sich nur durch das abweichende Verhalten der Anhänge des Genitalconus vom Typus unterscheiden, da diese Anhänge in hohem Grade variabel sind. Ich unterscheide solche Varietäten aber in Fällen, wo Uebergangsformen zwischen Typus und Varietät nicht bekannt sind.

5. C. sagittatum Kotlán.

Diese Art wurde in Ungarn, England (le Roux) und im Indischen Archipel aufgefunden (Smit en Notosoediro, V. M. Nr. 44. p. 2. Fig. 2). Fräulein Theiler (p. 38. Pl. X) veröffentlicht Abbildungen nach Kotlán.

6. C. coronatum (Looss).

Subgenus 2. Cylicocercus Ihle.

7. C. alveatum (Looss).

In Afrika, besonders im Zebra (Theiler 1923. p. 39).

8. C. catinatum (Looss).

8a. C. catinatum var. pseudocatinatum (Yorke et Macfie).

8b. C. catinatum var. litoraureum (Yorke et Macfie).

Le Roux (1924. p. 125) will von diesen Varietäten nichts wissen. So lange aber nicht zwischen diesen Varietäten und dem Typus Uebergangsformen gefunden sind, müssen wir m. E. die Varietäten als selbständige Formen unterscheiden. Zugunsten dieser Auffassung spricht das Auffinden von Exemplaren in Java (Smit en Notosoediro, V. M. Nr. 41), bei welchen die Anhänge des Genitalkonus völlig mit den von var. litoraureum der Goldküste übereinstimmen.

9. C. pateratum Yorke et Macfie.

10. C. Goldi Boulenger.

10a. C. Goldi var. tridentatum (Yorke et Macfie).

Diese Varietät unterscheidet sich der Hauptsache nach vom Typus durch das Fehlen der Anhänge des Genitalkonus. Le Roux (1924. p. 125) macht keinen Unterschied zwischen beiden. Bemerkt sei, daß bei C. Goldi die Elemente der inneren Blätterkrone keine Plättchen sind wie bei den übrigen Arten dieser Untergattung, was nicht aus

den Figuren in der Literatur hervorgeht. Im optischen Durchschnitt durch die Mundkapsel sieht man, daß diese Plättchen dreieckig sind.

Subgenus 3. Cylicotetrapedon n. subg.

Dieses Subgenus gründe ich für C. asymmetricum G. Theiler und eine neue Art, welche ich anfänglich zu C. asymmetricum gerechnet habe. Da aber die Unterschiede zwischen der Beschreibung von Fräulein Theiler und den von mir studierten Exemplaren ziemlich bedeutend sind, glaube ich, letztgenannte vorläufig als zu einer neuen Art gehörend betrachten zu dürfen.

Das Subgenus Cylicotetrapedon zeigt folgende Merkmale: 15—16 Elemente der äußeren Blätterkrone. Elemente der inneren Blätterkrone bei Betrachtung von außen breit und kurz, etwa viereckig, erinnernd an die der Gattung Craterostomum. Mundkapselwand vorn dicker als hinten, ventral länger als dorsal. Hinterende des ♀ gerade.

Wegen der etwa viereckigen Gestalt der Elemente der inneren Blätterkrone nenne ich die neue Subgattung Cylicotetrapedon. Als Typus wähle ich die neue Art C. bidentatum, da ich die zuerst beschriebene Art C. asymmetricum selber nicht untersucht habe.

Bemerkt sei, daß Cylicotetrapedon Uebereinstimmung zeigt mit C. (Cylicocercus) Goldi (Boulenger) durch den Besitz einer Mundkapselwand, welche vorn dicker ist als hinten. Außerdem besitzt C. Goldi Zähne im Oesophagustrichter und 1 Paar Fortsätze am Dermalkragen wie C. bidentatum. Cylicotetrapedon unterscheidet sich aber von Cylicocercus durch das gerade Hinterende des ♀ und die geringere Länge der Elemente der inneren Blätterkrone.

C. asymmetricum wird von G. Theiler (1923. p. 22) zur Subgattung Cylicostephanus, von le Roux (1924. p. 126) zu Cylicocercus gerechnet. Ich glaube aber, daß die Unterbringung in eine neue Subgattung allein richtig ist.

11. C. bidentatum n. sp. (Fig. 1—4).

Von dieser Art fand ich in Holland bei 3 Pferden 4 Exemplare. Länge des ♂ 7,5 mm, maximale Dicke 360 μ; Länge des ♀ 9,5 mm, maximale Dicke 500 μ.

Der Mundkragen ist mäßig hoch und durch eine Einschnürung abgesetzt. Die lateralen Mundpapillen ragen nicht hervor, die submedianen sind hoch. Der kleine distale Teil letztgenannter Papillen ist deutlich gegen den übrigen Teil abgesetzt. Die äußere Blätterkrone besteht aus etwa 16 Elementen, welche spitz sind und weit aus dem Mundkragen hervorragen. Bei 2 Exemplaren sind die Spitzen nach hinten gebogen.

Die Länge der Mundkapsel ist ventral größer als dorsal. Bei einem Exemplar ist die medio-dorsale Wand (vom Vorderrand bis zum Oesophagus!) 21 μ, die medio-ventrale Wand (vom Vorderrand bis zum Hinterrand!) 33 μ lang. Bemerkt sei, daß der Hinterrand der Mundkapsel weit in den Oesophagustrichter hineinragt, und zwar am meisten medio-ventral, am wenigsten medio-dorsal. Die Oeffnung der Mundkapsel ist vorn 60 μ weit. Die dorsale Rinne ist gut entwickelt, aber endet hinter der Ursprungsstelle der Elemente der inneren Blätterkrone. Wichtig ist, daß die Mundkapselwand vorn ihre größte Dicke hat. Die Elemente der inneren Blätterkrone sind kurz und breit, ungefähr quadratisch. Im optischen Durchschnitt durch die Mund-

kapsel sind es dreieckige Plättchen, deren Ursprungsstelle sich nicht weit nach hinten ausdehnt. Ihre Zahl beträgt etwa 22.

Der Oesophagus ist kurz und ziemlich dick. Hinter der Mundkapsel nimmt die Dicke etwas ab. Kurz vor dem Hinterende ist der Oesophagus nur wenig angeschwollen. Länge beim ♂ 410—510 μ, größte Breite 115—125 μ, Länge beim ♀ 530 μ, größte Breite 115 μ.

Ein wichtiges Merkmal dieser Art ist das Vorkommen von 1 Paar deutlicher dreieckiger latero-ventraler Zähne im Oesophagustrichter,

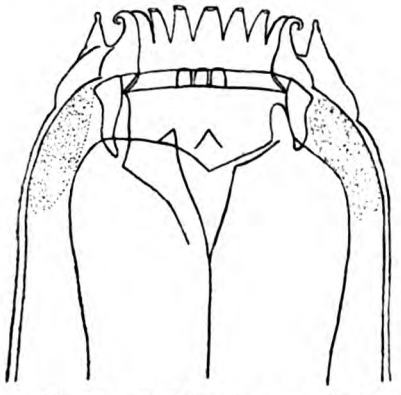


Fig. 1. Cylicostomum bidentatum. Vorderende etwas schräg von der Seite gesehen. × 460 (× ¾).

Fig. 2. Cylicostomum bidentatum. Bursa copulatrix, von der Seite und von hinten gesehen. × 110 (× ¾).

Fig. 3. Cylicostomum bidentatum. Genitalconus mit Anhängen, Dermalkragen mit Fortsätzen. × 460 (× ¾).

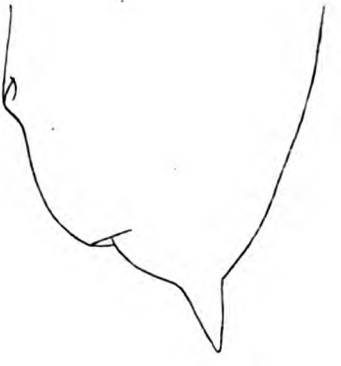


Fig. 4. Cylicostomum bidentatum. Hinterende des ♀ von der Seite gesehen. × 270 (× ½).

welche in die Mundkapselhöhle hineinragen. Medio-dorsal trägt der Oesophagustrichter nur einen deutlichen Vorsprung, keinen eigentlichen Zahn, so daß ich für diese Art den Namen C. bidentatum vorschlage.

Der Rand der Bursa copulatrix ist äußerst fein gezähnelt. Der mäßig lange mediane Lappen der Bursa copulatrix ist deutlich den lateralen Lappen gegenüber abgegrenzt. Akzessorische Rippen fehlen.

Der Abstand vom Ursprung der Rippe ED bis zum Hinterende von D 3 beträgt 430 μ. Der Spalt zwischen rechter und linker Rippe D 3 endet 370 μ vor dem Hinterende von D 3. Die Rippen ML und PL verlaufen einander genähert parallel zum Rand der Bursa, während die Rippe EL gleich schräg nach vorn gerichtet ist und weit vom Ende von ML und vom Rand der Bursa entfernt endet. Der Dermalkragen ist gut entwickelt. Bei einem (vielleicht typischen) Exemplar (Fig. 3) finde ich ein paar kurze konische Anhänge am Genitalkonus, welche je 2 fingerförmige Fortsätze tragen, während der hintere Teil des Dermalkragens lateral von den Anhängen jederseits einen schlanken, etwas medianwärts gerichteten Fortsatz trägt wie bei C. labiatum. Beim 2. Exemplar ist der Genitalkonus nicht normal, während das 3. Exemplar, welches ich intakt gelassen habe, für die Untersuchung des Genitalkonus nicht sehr geeignet ist.

Das Hinterende des ♀ nimmt hinter der Vulva und noch stärker hinter dem After an Dicke ab. In einiger Entfernung hinter dem Anus setzt der Körper sich in eine deutlich abgesetzte konische Spitze fort. Der Abstand von der Vulva zum Anus beträgt etwa 145 μ, der Abstand vom Anus bis zum Ende der hinteren Spitze beträgt (der Körperachse parallel gemessen) 110 μ.

Von der nahe verwandten C. asymmetricum unterscheidet C. bidentatum sich namentlich durch folgende Merkmale: Die Elemente der inneren Blätterkrone sind bei beiden Arten kurz und breit, bei C. asymmetricum aber palissadenartig, bei C. bidentatum viereckig. Die Zähne des Oesophagustrichters letztgenannter Art werden von Miss Theiler für C. asymmetricum nicht erwähnt. Bei C. asymmetricum sind die lateralen Rippen der Bursa divergent und der Abstand zwischen den Enden von EL und ML nach der Zeichnung von Miss Theiler nur wenig größer als der Abstand zwischen den Enden von ML und PL, während bei C. bidentatum der erstgenannte Abstand viel größer ist als der zweite. Die Anhänge des Genitalkonus sind bei C. asymmetricum in der Medianlinie verwachsen, bei C. bidentatum ist dies nicht der Fall. Fortsätze am Dermalkragen werden für C. asymmetricum nicht erwähnt. Die Spitze am Hinterende des ♀ ist bei C. bidentatum viel deutlicher gegenüber dem Hinterende abgesetzt als bei C. asymmetricum.

12 C. asymmetricum G. Theiler (1923. p. 57).

Miss Theiler beschreibt diese Art von Südafrika, le Roux (1924. p. 126) von England.

Subgenus 4. Cylicocyclus Ihle.

13. C. radiatum (Looss).

In England (le Roux. p. 122), S.-Afrika (Theiler. p. 44), im Indischen Archipel (Smit en Notosoediro. V. M. Nr. 44, p. 5) und Kanada.

14. C. triramosum Yorke et Macfie.

Im Zebra, S.-Afrika (Theiler. p. 46).

15. C. elongatum (Looss).

15a. C. elongatum var. Kotláni Ihle.

16. C. insigne Boulenger = Trichonema tetracanthum (Mehlis) volgens Railliet.

Railliet (1923. p. 14) betrachtet diese Art als eine blutsaugende, während die übrigen Cylicostomum-Arten sich nach ihm vom Darm-

inhalt des Wirts ernähren. Dagegen haben Van Oordt und ich (1923. p. 34; Ihle 1924. p. 444) früher zu zeigen versucht, daß diese Art sich wahrscheinlich in derselben Weise ernährt wie die anderen Cylicostomum-Arten. Wir hatten angenommen, daß die rote Farbe der jungen Exemplare von C. insigne die Folge war von Aufnahme von Blut während des Larvenstadiums. Da aber le Roux (1924. p. 117) Exemplare von C. coronatum, longibursatum und Goldi an der Mucosa angeheftet fand, ist es wahrscheinlich, daß Cylicostomum, auch nach der letzten Häutung, bisweilen Blut saugt. Van Oordt und ich (l. c.) bemerkten weiter, daß C. insigne wahrscheinlich nicht die einzige Art ist, welche eine rote Farbe aufweist. Diese Vermutung wird bestätigt durch die Mitteilung von le Roux (1924. p. 21), daß C. longibursatum, C. calicatum, C. minutum und C. Goldi bisweilen rötlich sind. Auch bestritt ich (1924. p. 444) die Vermutung von Railliet (1923. p. 11), daß nur die Larven von C. insigne in der Darmwand leben. Hiermit steht im Einklang, daß le Roux (p. 121) auch die Larven von C. elongatum in der Submucosa fand. Es it wohl nicht zweifelhaft, daß die Unterschiede, welche die Larven des 4. Stadiums, welche die Darmwand (Mucosa und Submucosa, le Roux 1924. p. 117, 121) bewohnen, aufweisen, darauf beruhen, daß die Larven aller Cyclostomum-Spezies hier vorkommen.

17. C. Adersi Boulenger.

18. C. auriculatum (Looss).

19. C. nassatum (Looss).

19a. C. nassatum var. parvum Yorke et Macfie = C. Ashworthi le Roux.

Le Roux (1924. p. 124) betrachtet Exemplare einer Cyclostomum-Art, welche außer einem lateralen Ast an der Rippe D 3 der Bursa copulatrix noch einen lateralen Ast an der Rippe D 2 aufweisen, als zu einer neuen Art, C. Ashworthi, gehörend. Er meint, daß Miss Teiler und ich solche Exemplare, von uns zu C. nassatum parvum gerechnet, gesehen haben. Ich glaube indessen, daß C. Ashworthi spezifisch nicht von C. nassatum parvum verschieden ist. Die wichtigsten Merkmale von C. Ashworthi gegenüber C. nassatum parvum sind nach le Roux: laterale Papillen kleiner als bei C. nassatum, Mundkapsel fast rund im Querschnitt, Elemente der inneren Blätterkrone deutlich sichtbar, Rippe D 2 mit Seitenzweig, Hinterende des Weibchens stumpfer als bei C. nassatum.

Von den hervorgehobenen Unterschieden gegenüber C. nassatum parvum — mit welcher Art auch le Roux seine neue Spezies „most closely related" achtet — scheint der Unterschied in der Gestalt der Mundkapsel die wichtigste zu sein. Bei C. Ashworthi ist die Mundkapsel fast rund im Querschnitt, bei C. nassatum oval. Nun ist bei konservierten Exemplaren letztgenannter Art die Gestalt des Mundes und der Mundkapsel außerordentlich variabel je nach dem Kontraktionszustand des Mundkragens. So beobachtete ich Exemplare, welche nach dem Bau der Bursa zu C. nassatum parvum gehören, mit runder (selten), typisch quer-ovaler und spaltförmiger Mundöffnung, während die Mundkapsel auf dem Querschnitt typisch quer-oval, aber auch schwach dreieckig sein kann mit fast gleichlanger transversaler und dorso-ventraler Achse und mit einer platten dorsalen und einer konvexen ventralen Seite. Diese beiden Formen der Mundkapsel fand ich ebensogut bei Exemplaren, welche nach dem Bau der Bursa zu

C. Ashworthi gehören und eine ovale Mundöffnung besitzen. Auch den übrigen von le Roux genannten Unterschieden kann ich keine spezifische Bedeutung zuschreiben. So ist das Aussehen der lateralen Papillen abhängig von dem Kontraktionszustand des Mundkragens. Deshalb betrachte ich le Roux' C. Ashworthi als synonym mit C. nassatum parvum.

20. Cylicostomum (Cylicocyclus) leptostomum Kotlán = C. bogoriense Smit et Notosoediro. 1923. V. M. Nr. 43. p. 1).

Le Roux (1924. p. 122) bemert, daß C. bogoriense wahrscheinlich identisch ist mit C. leptostomum Kotlán. Ich teile diese Ansicht nach Untersuchung von Exemplaren von C. bogoriense, welche Herr Dr. Smit so freundlich war, mir von Java zu senden.

Der wichtigste Unterschied zwischen Kotláns C. leptostomum und Smits C. bogoriense liegt in dem Verhältnis der Durchmesser der Mundkapsel. Nach Kotlán ist der transversale Durchmesser (54 μ) ungefähr zweimal so groß als der dorsoventrale. Nach Smit ist der Unterschied beider Durchmesser nur unbedeutend: transversaler Durchmesser 43 μ, dorsoventraler Durchmesser 39,6 μ. Auch bei den wenigen von mir untersuchten Exemplaren aus Holland ist der Unterschied sehr unbedeutend (größter Durchmesser 46—54 μ). Ich habe versäumt, dies im Rapport der Sclerostomiasis-Commission (1922) zu erwähnen. Gertrud Theiler, die Exemplare von C. leptostomum aus S.-Afrika beschreibt, erwähnt den Unterschied zwischen beiden Durchmessern nicht und gibt als Breite der Mundkapsel 36 μ an. Wenn bei den von Kotlán in Ungarn gesammelten Exemplaren der transversale Durchmesser konstant ungefähr zweimal so groß ist wie der dorsoventrale, wären die von Smit, Gertrud Theiler und mir untersuchten Exemplare, bei welchen beide Durchmesser ungefähr ebenso lang sind, als zu einer selbständigen Varietät (C. leptostomum var. bogoriense) gehörend zu betrachten.

Eine wichtige Besonderheit dieser Art, welche ich bei den holländischen Exemplaren wahrnahm und die auch von Gertrud Theiler (1923, pl. XXI, fig. A) abgebildet wird, liegt im Verhalten des Hinterendes des Oesophagus, welches tief in den Mitteldarm hineinragt. Dies gilt auch für die von mir untersuchten Exemplare aus Java, obwohl Smit und Notosoediro auf ihrer Fig. 1b diese Eigentümlichkeit nicht zeichnen.

Sowohl Kotlán als Theiler und Smit erwähnen die akzessorischen Rippen der Bursa, welche auch bei den holländischen Exemplaren vorhanden sind. Die Anhänge des Genitalconus sind offenbar sehr variabel, wie es auch von anderen Arten bekannt ist. Bei einem von mir untersuchten Exemplar aus Holland berühren die Anhänge einander in der Medianlinie. Dasselbe finde ich bei einem Exemplar aus Java. Dem holländischen Exemplar fehlen aber der dicke und der dünne Fortsatz, welche bei den javanischen Exemplaren vorkommen. Fräulein Theiler nennt die Anhänge gelappt. Sie erwähnt aber zahlreiche Fortsätze an den Anhängen, während diese bei den ungarischen, holländischen und javanischen Exemplaren je 2—0 Fortsätze tragen.

Diese Art ist gefunden in England (le Roux), Holland, Ungarn, S.-Afrika, im Indischen Archipel und in N.-Amerika (Cram).

Subgenus 5. Cylicostephanus Ihle.

21. C. calicatum (Looss).

22. C. barbatum Smit et Notosoediro. 1923. V. M. Nr. 43, p. 7.

Von dieser Art erhielt ich durch die Freundlichkeit von Herrn Dr. Smit einige Exemplare aus Java. Ich bemerke, daß sie sehr nahe mit C. calicatum verwandt ist. Von letztgenannter Art unterscheidet sie sich nur durch folgende Merkmale: entwas kleinere Zahl (12—14) der Elemente der äußeren Blätterkrone, meistens etwas größere Länge der Mundkapsel (37—49,5 μ), und insbesondere durch den Besitz von 3 Zähnen im Oesophagustrichter.

Weiter bemerke ich folgendes: Die Lage der Exkretionsöffnung ist etwas variabel und manchmal etwas weiter nach vorn (hinter dem Schlundring) als Smit und Notosoediro angeben. Die Länge des Oesophagus beträgt bei den von mir gemessenen ♂♂ 265—285 μ, bei den ♀♀ 265—320 μ, nach den Angaben von Smit und Notosoediro resp. 336 und 352 μ. Bei 2 ♂♂ war der Abstand vom Ursprung der Rippe ED bis zum Hinterende von Rippe D 3 450 μ. Die Anhänge des Genitalconus mit ihren fingerförmigen Fortsätzen stimmen im wesentlichen mit den von C. calicatum nach der Beschreibung von Gertrud Theiler (p. 53) überein. Der Abstand zwischen Anus und Hinterende kann kleiner (95 μ) sein als Smit und Notosoediro angeben (148,5 μ). Bei den von mir untersuchten Exemplaren war der Abstand Vulva—Anus nicht genau zu messen.

23. C. minutum Yorke et Macfie.

24. C. longibursatum Yorke et Macfie.

25. C. hybridum Kotlán.

Diese Art ist außer in Ungarn auch in England (le Roux) aufgefunden.

26. C. poculatum (Looss).

Subgenus 6. Cylicodontophorus Ihle.

In bezug auf diese Subgattung, deren Typus C. bicoronatum ist, bemerkt le Roux (p. 126), daß C. euproctus und C. Mettami nicht in derselben Subgattung bleiben können wie C. bicoronatum und C. ultrajectinum. Zweifelsohne zeigen C. Mettami und euproctus unter sich eine nähere Verwandtschaft durch den langen kontraktilen Genitalconus und die zahlreichen schmalen Elemente der äußeren Blätterkrone. Wenn wir aber diese beiden Arten aus der Untergattung Cylicodontophorus entfernen, bleiben nur C. bicoronatum und C. ultrajectinum zurück, welche nicht sehr nahe miteinander verwandt sind. C. bicoronatum weicht ab durch die Gestalt des Hinterendes des Weibchens, während C. ultrajectinum eine besondere Stelle einnimmt, durch die großen, wenig zahlreichen Elemente der äußeren Blätterkrone und die ringförmige Verdickung am Hinterrand der Mundkapsel, wie sie in der Untergattung Cylicocyclus vorkommt. Deshalb möchte ich vorläufig die 4 Arten im Subgenus Cylicodontophorus belassen.

27. C. bicoronatum (Looss).

28. C. ultrajectinum Ihle.

Außer in Holland und Ungarn auch in England (le Roux. p. 126), S.-Afrika (Theiler. p. 61) und N.-Amerika (Cram) aufgefunden.

29. C. Mettami Leiper = C. Ihlei Kotlán.

Ich stimme le Roux (1924. p. 126) völlig bei, der C. Ihlei Kotlán für identisch hält mit C. Mettami Leiper. Der Genitalconus hat eine variable Länge. Dies hat nach Gertrud Theiler (1923. p. 60) und le Roux seine Ursache in der Kontraktilität dieses Organs.

Diese Annahme ist in Uebereinstimmung mit der Tatsache, daß auch bei anderen Arten mit langem Genitalconus (C. euproctus, Gyalocephalus capitatus) Exemplare mit kurzem Genitalkonus aufgefunden werden. Ich bemerke, daß auch bei dieser Art, wie bei den anderen der Subgattung, die Elemente der inneren Blätterkrone im optischen Durchschnitt durch die Mundkapsel dreieckige Plättchen sind. Dies geht nicht aus le Roux' neuer Figur (1924. Fig. 7) hervor.

In England, Holland, Ungarn und S.-Afrika (Theiler. p. 60).

30. C. euproctus (Boulenger).

Diese in Europa gefundene Art wurde von Gertrud Theiler (1923. p. 59) auch in S.-Afrika wahrgenommen.

Brevicapsulatum-Gruppe.

31. C. brevicapsulatum Ihle.

Von dieser zuerst in Holland gefundenen Art fand Gertrud Theiler (1923. p. 62) ein ♀ in S.-Afrika.

32. C. prionodes Kotlán.

Montgomeryi-Gruppe.

33. C. Montgomeryi Boulenger.

Literaturverzeichnis.

Boulenger, Ch. L. 1917. Sclerostome parasites of the horse in England. II. New species of the genus Cylichnostomum. (Parasitology. Vol. 9.) — Cram, E. B. 1924. New records of Horse Strongyles. (Journ. parasit. Vol. 11. p. 91.) — Ihle, J. E. W. 1921. On the genus Cylicostomum. (Ann. trop. med. parasit. Vol. 15.) — Ders. 1922. Rapport der Commissie voor het Sclerostomiasis-onderzoek in Nederland. I. Zoöl. gedeelte. 1e stuk. De in den dikken darm van het paard levende volwassen Strongyliden (Sclerostomen). (Holländischer und englischer Text.) — Ders. 1924. Over de nomenclatuur en de biologie van het geslacht Cylicostomum. (Tijdschrift voor diergeneeskunde. Dl. 51.) — Ders. and Oordt, G. J. van. 1923. On some Strongylid larvae in the horse, especially those of Cylicostomum. (Ann. trop. med. parasit. Vol. 17.) — Macfie, J. W. S., and Yorke, W. 1923. Trichonema tetracanthum (Mehlis, 1831) of Looss, 1900. (Ann. trop. med. parasit. Vol. 17. p. 439.) — Railliet, A. 1923. Le véritable Strongylus tetracanthus Mehlis et son rôle pathogène. (Annales de parasitologie. T. 1.) — Le Roux, P. L. 1924. Helminths collected from Equines in Edinburgh and in London. (Journ. helminthology. Vol. 2.) — Smit, H. J. 1922. Eenige Strongyliden van het Indische paard. Ned.-Ind. Bladen v. diergeneeskunde en dierenteelt. Dl. 33. afl. 3. — Ders. en Notosoediro, R., Nog eenige Strongyliden van het paard op Java. I. Veeartsenijk. mededeeling. No. 39. Dep. van landb. nijverh. handel; II. ibid. No. 41; III. ibid. No. 43; IV. ibid. No. 44. — Theiler, G. 1923. The Strongylids and other Nematodes parasitic in the intestinal tract of South African Equines. Thèse, Neuchâtel (auch in: 9. and 10. Rep. of the Director of Veterinary education and research, April 1923. Union of S. Afr., Dep. of Agric.).

Nachdruck verboten.

Beitrag zur Wirkung von Röntgen- und Ultraviolettstrahlen auf Antikörper in vivo und vitro.

[Aus der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes, Zweigstätte Scharnhorststraße (frühere Kaiser Wilhelms-Akademie).]

Von Ober-Reg.-Rat Professor Dr. **Konrich.**

Mit 10 Kurven im Text.

Die außerordentlich umfangreiche Anwendung der Röntgen- und Ultraviolettstrahlen zu Heilzwecken läßt die Annahme entstehen, daß der innere Vorgang, der sich dabei abspielt, einigermaßen bekannt ist oder daß doch wenigstens völlige Klarheit darüber herrscht, wie meßbare Körperzustände, deren ja eine ganze Anzahl uns zur Verfügung ständen, unter dem Einfluß dieser Formen der strahlenden Energie sich verhalten. Aber die Umschau im Schrifttum zeigt, daß weder das eine noch das andere zutrifft. Ueber das innere Geschehen bei der Strahlenwirkung bestehen nur Mutmaßungen, für die irgendwelche verläßlichen Unterlagen einstweilen durchaus fehlen. Und über Veränderungen von Körperzuständen liegt zwar eine nicht ganz unbedeutende Anzahl von Untersuchungen vor, ohne daß jedoch auch nur über eine einzige Frage bisher Einhelligkeit hätte erreicht werden können. Dazu sind die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen noch zu uneinheitlich, oft geradezu widersprechend selbst bei einem, wie man meinen sollte, scharf umschnittenen Einzelfall. Man darf hierbei nicht außer acht lassen, daß die Versuchsanordnungen auf diesem Gebiete außerordentlich verschieden sein können und daß es durchaus nicht von der Hand zu weisen ist, wenn man etwaige verschiedene Ergebnisse auf solche Ursachen zurückführt. Besonders bei der Verwendung von Röntgenstrahlen nehmen wirklich umfassende Versuche ganz ungewöhnlichen Umfang an, weil durch die verschiedenen Filter, verschieden harten Röhren, die oft lange Zeit bis zum Eintritt einer Wirkung, die hohe Empfindlichkeit mancher Versuchstiere, die verschiedenen Strahlenmengen u. a. m. sehr viele verschiedene Versuchsreihen nötig würden. Bei kritischer Würdigung der bisher vorliegenden Ergebnisse wird man sie daher vorsichtigerweise in der Hauptsache als Tatsachenstoff über die Wirkung von Röntgen- und Ultraviolettstrahlen ansehen, die Verwertung zur Formung darauf bezüglicher biologischer Gesetze aber zurückstellen, bis viel mehr Beobachtungen über das Gebiet vorliegen.

Diesem Zwecke wollen auch die nachfolgenden Beobachtungen dienen. Sie umfassen nur einen ganz bestimmten, und zwar willkürlich begrenzten Ausschnitt aus dem biologischen Strahlengeschehen, nämlich die Wirkung begrenzter Mengen gefilterter Röntgenstrahlen und — natürlich ungefilterter — Ultraviolettstrahlen auf die Bildung von verschieden gebauten Antikörpern im lebenden Warmblüter innerhalb begrenzter Zeit. Sodann die Wirkung ungefilterter Röntgenstrahlen und Ultraviolettlicht auf fertige Antikörper außerhalb des lebenden Tieres sowie auf die zugehörigen Antigene. Zu einem eindeutigen Er-

gebnis haben diese Versuche nur teilweise geführt, trotzdem sie an sich nicht auf schmaler Grundlage stehen. Ihre Mitteilung dürfte sich gleichwohl rechtfertigen, da sie, wie oben gesagt, lediglich als Vermehrung des bisherigen Tatsachenstoffes gedacht sind.

Es sind 3 Gruppen von Versuchen zu unterscheiden.

A. Wirkung von Ultraviolettstrahlen auf Antikörper in vivo,
B. Wirkung von Röntgenstrahlen auf Antikörper in vivo,
C. Wirkung von Röntgenstrahlen auf Antikörper in vitro.

A. Die Wirkung von Ultraviolettstrahlen auf den Immunisierungsvorgang von Meerschweinchen, die mit wärmegetöteten Typhusbazillen intraperitoneal behandelt wurden, haben Potthof und Heuer[1]) (siehe dort auch Uebersicht über die geringe bisher vorliegende Literatur) untersucht. Sie fanden, daß bei Tieren mit farbstoffhaltiger Haut die Bestrahlung den Agglutinationstiter erhöhte, bei Albinos nicht. Bei fertig immunisierten Tieren stieg der Titer zunächst an, um dann sehr rasch zu fallen. Die Antikörper werden unter der Bestrahlung also abgebaut. Weitere Beobachtungen über dies Gebiet liegen bisher nicht vor.

Versuchstechnik.

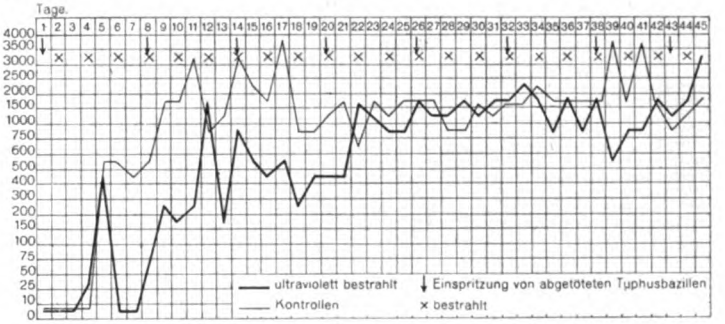
Die Bestrahlungen wurden unter einer sogenannten Höhensonne, wie sie zur Behandlung kranker Menschen gebraucht werden, vorgenommen. Als Versuchstiere dienten in allen Versuchen nur Kaninchen, und zwar nur große ausgewachsene Tiere. Da es nach der Erfahrung über die leichte Absorbierbarkeit von Ultraviolettstrahlen wenig aussichtsreich erschien, bei den Tieren einen Erfolg zu erwarten, solange sie ihr volles Haarkleid hatten, wurde der ganze Rücken geschoren und dann mit Strontiumsulfit-Talkummischung gänzlich enthaart. Kaninchen vertragen eine derartige Entblößung wenig gut; sie sind dem dauernden erheblichen Wärmeverlust, der danach einsetzt, offenbar schlecht gewachsen. Dann erhielten die Tiere durch Wärme (1 Std. 60° Wasserbad) abgetötete Typhusbazillen intravenös, angefangen mit $^1/_2$ Oese, unter Verdoppelung der Menge bei jeder folgenden Einspritzung. Die Bestrahlung erfolgte zunächst in einem Abstand von 1 m von der Strahlenquelle, der jedesmal um 10 cm verringert wurde und dann bei 0,5 m stehen blieb. Die Bestrahlungsdauer betrug 5—10—15— usw. Min. bis 30 Min., welche Zeit dann beibehalten wurde. Die Tiere bekamen anfänglich eine leichte Hautentzündung.

Da der Agglutinationstiter im Laufe der Immunisierung bei einem einzelnen Tier sehr große Schwankungen aufweisen kann, wurden die Beobachtungen von einzelnen Kaninchen nicht verwertet, sondern statt dessen die täglichen Mittelwerte aller Versuchswerte berechnet. Man darf dann wohl annehmen, daß individuelle Schwankungen des Titers, die einen Strahleneinfluß vortäuschen können, vermieden werden und daß etwaige Strahlenwirkungen deutlich in die Erscheinung treten. Kurve 1 zeigt einen solchen Versuch von 45tägiger Dauer.

Das Gesamtergebnis spricht bei dieser Versuchsbedingung nicht deutlich für einen Strahleneinfluß. Anfänglich bleiben die Werte bei den bestrahlten Tieren hinter den Kontrollen zurück. Da die Kontrolltiere in gleicher Weise enthaart wurden, ist die Ursache dafür in der

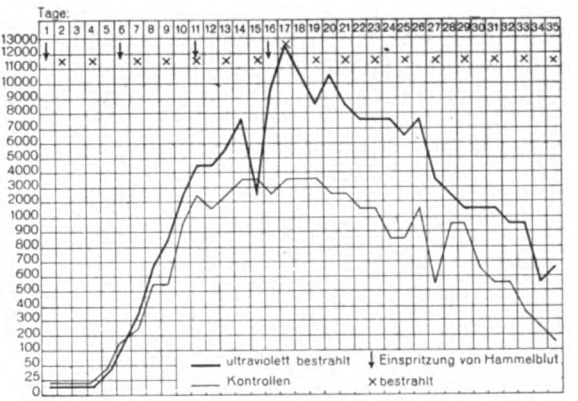
1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88. S. 299.

Bestrahlung zu sehen. Dann decken sich die Schaulinien der Durchschnittswerte praktisch völlig, und gegen Ende des Versuches liegen sie bei den bestrahlten Tieren immerhin nicht unbeträchtlich höher. Alles in allem wird man hinsichtlich der Strahlenwirkung hier nur sagen: non liquet.



Kurve 1.

Ganz anders sehen die Ergebnisse aus, wenn man statt Typhusbazillen gewaschene Blutkörperchen zur Immunisierung verwendet (Kurve 2). Zuerst gehen die beiden Schaulinien fast parallel. Dann



Kurve 2.

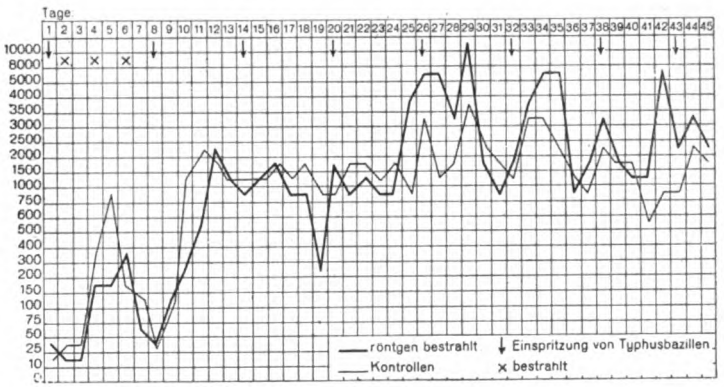
aber, etwa vom 10. Tage ab, steigt die Blaulichtlinie ganz bedeutend über die Linie der Kontrolltiere hinaus. Während letztere um den gewohnten Gipfelpunkt von 2—3000 liegt, geht die Linie der Höhensonnentiere bis zum 4fachen dieser Zahl hinauf und bleibt auch gegen Ausgang des Versuches ganz bedeutend höher.

Man kann hier demnach wohl mit Sicherheit annehmen, daß die Ursache der Titersteigerung in der Einwirkung der ultravioletten Strahlen gesehen werden muß.

B. Ueber die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Antikörper in vivo liegen einige Beobachtungen vor, die im III. Bande des Lehrbuchs der Röntgenkunde von Rieder und Rosenthal[1]) zusammen-

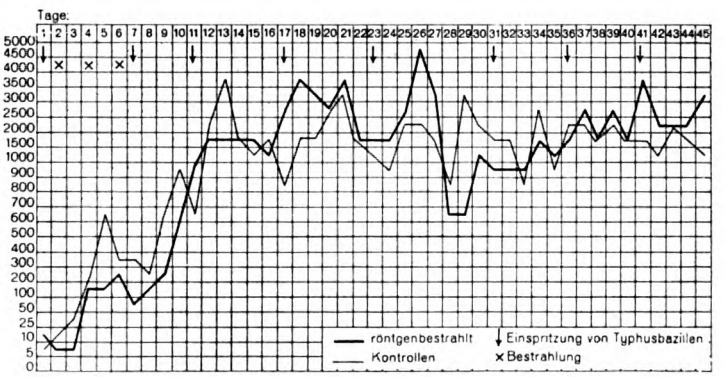
1) Leipzig 1922.

getragen sind. Bei Bestrahlung von Blutserum fanden Burmann und Tinsa Herabsetzung des hämolytischen Vermögens und Komplementschädigung. Läwen sah Hemmung der Agglutinations- und wahrscheinlich auch Bakteriolysinbildung; Normalagglutinine waren unempfindlich. Fränkel und Schilling sahen das gleiche und bei Hämolysinen ähnliches. Benjamin und Sluka beobachteten Hemmung



Kurve 3.

der Präzipitinbildung, was Leidenfrost bestreitet. Bei Tuberkulösen sahen einige Beobachter Steigerung der Abwehrkräfte nach Bestrahlung der Milz, andere vermissen diesen Erfolg. Manakhine fand nach Milzbestrahlung Zunahme der Choleraagglutinine und Hammelbluthämolysine, während Kaznelson und Lorant bei Typhusrekon-



Kurve 4.

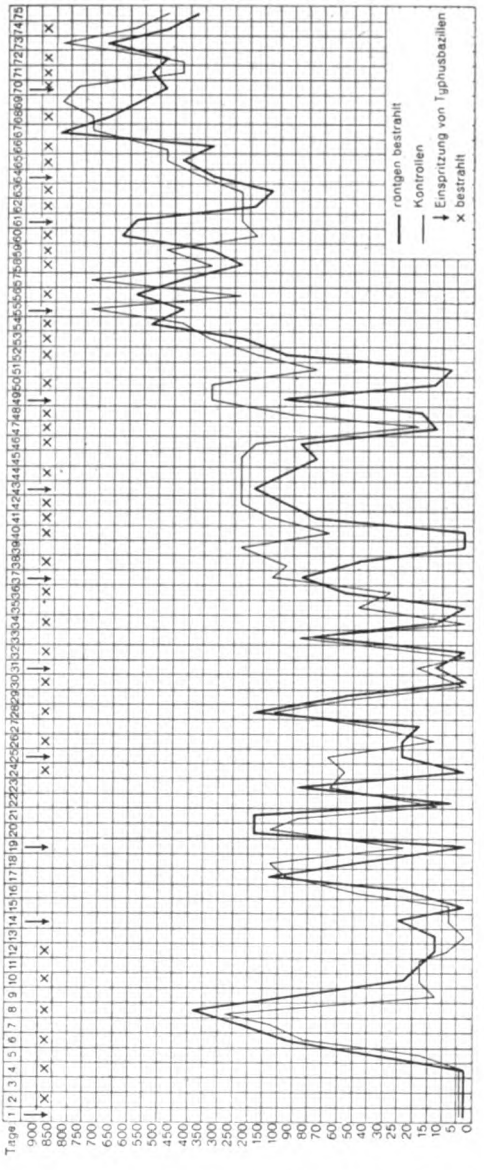
valeszenten durch Bestrahlung von Milz, Leber, Knochenmark oder Bauch kurzdauernde Vermehrung der Typhusagglutinine erhielten. — Im ganzen also: keine einheitlichen Ergebnisse.

Bei den folgenden Versuchen sind Kaninchen teils gegen Typhusbazillen, die durch 1stdig. Erwärmen auf 60° im Wasserbade abgetötet

waren, teils gegen gewaschene Hammelblutkörperchen durch intravenöse Einspritzung immunisiert worden.

Von dem Typhusantigen erhielten die Tiere Dosen von $^1/_2$ Oese, die nach und nach jeweils unter Verdoppelung der Dosen bis auf eine Gesamtmenge von 127 Oesen stieg. Blutproben wurden täglich entnommen und in bekannter Weise austitriert.

Die Bestrahlung erfolgte im Abstand von 23 bis 25 cm durch ein Aluminiumfilter von 3 mm Dicke. Die Beleuchtungsdauer schwankte von 5 bis 10 usw. bis 30 Min. und wurde mit $2\,^1/_2$ Milliampere vorgenommen. In einigen Versuchen wurden die Tiere nur dreimal bestrahlt: 5 Min. 60 F, 10 Min. 120 F, 15 Min. 180 F. In einem anderen Versuch wurden die Tiere täglich bestrahlt, nach Erreichen der 30-Minutendauer in Sprüngen von 5 zu 5 Min. von einem Tag zum anderen, dauernd täglich mit 30 Min. Die Tiere haben diese erheblichen Strahlenmengen ganz leidlich ertragen, wenn es auch nicht ohne Verluste abging. Die Versuchsdauer betrug bis zu 75 Tagen.

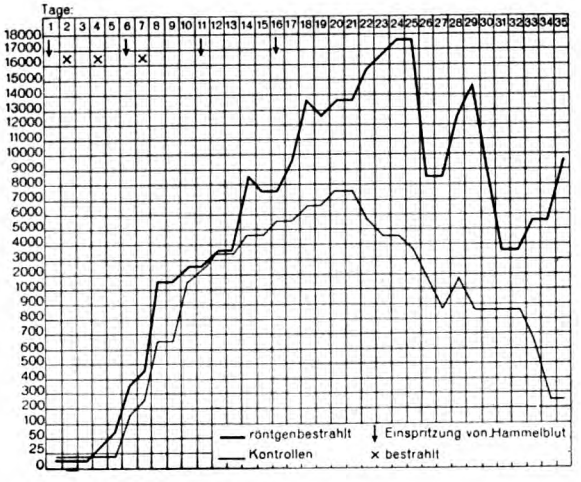


Kurve 5.

Die Schaulinien aller dieser Versuche (Kurve 3 bis 5) zeigen mit großer Deutlichkeit, daß bei der Immunisierung gegen abgetötete Typhusbazillen bei keiner Bestrahlungsweise irgendein Einfluß der Röntgenstrahlen auf den Gang des Agglutinationstiters nachzuweisen ist. Die geringe Erhöhung der Röntgenlinie in Kurve 2 gegen Schluß des Versuchs würde bei weiterer Ausdehnung der Beobachtung auf noch mehr Tiere sicher ganz eingeebnet werden.

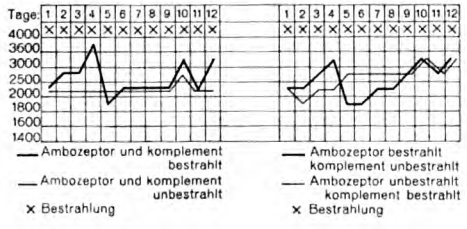
Erheblich anders sieht wieder das Ergebnis bei der Bildung von Hämolysinen unter Röntgenbestrahlung aus, wobei letztere in der oben be-

schriebenen Weise dreimal vorgenommen ist (Kurve 6). Während der ersten 12 Tage laufen beide Schaulinien fast parallel, dann aber steigt die Röntgenlinie schnell hoch über die Linie der Kontrolltiere hinaus und bleibt, wenn auch nicht dauernd in dem gleich weiten Abstand, aber dennoch dauernd bedeutend über ihr. Da dies Bild trotz der Durchschnittswerte aus allen Tieren (je 5 Röntgentiere und Kon-



Kurve 6.

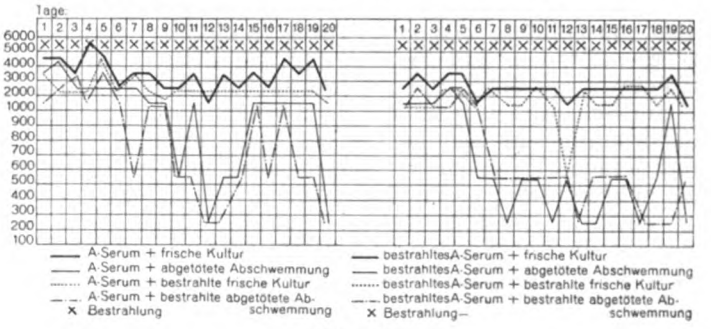
trolltiere) entstanden ist, darf man wohl als gesichert annehmen, daß bei diesen Versuchsbedingungen die Röntgenstrahlen die Ursache der Titersteigerung gewesen sind. Der „Röntgentiter" ist mehr als doppelt so hoch gestiegen gegenüber der höchsten Höhe des Titers der Kontrolltiere. Es liegt nahe, diese Erscheinung zu benutzen, zumal das Mittel zur Titersteigerung sehr einfach ist. Fraglich kann nur sein, ob die so erzeugten hämolytischen Ambozeptoren ebenso beständig sind wie die ohne Röntgenbestrahlung gewonnenen. Die Frage wurde nicht untersucht. Bemerkenswert ist jedenfalls, daß sowohl nach Ultraviolettbestrahlung wie auch nach Röntgenbestrahlung eine so erhebliche Steigerung des Ambozeptortiters beobachtet wurde. Das dürfte doch wohl dafür sprechen, daß beide Formen der strahlenden Energie zumindest gleich wirken können. Die Röntgenstrahlen wirken allerdings stärker als die Ultraviolettstrahlen.



Kurve 7.

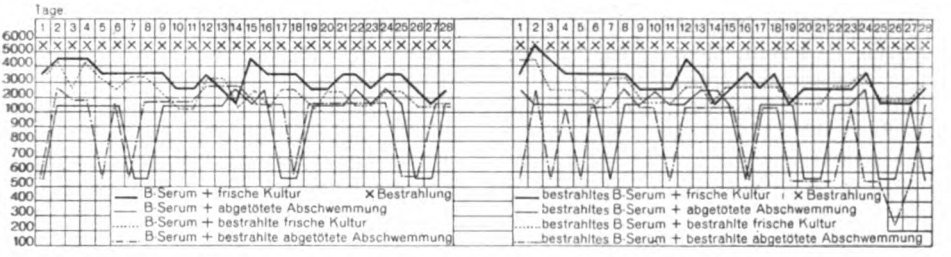
C. Bei der letzten Gruppe von Versuchen ist die Wirkung von Röntgenstrahlen auf hämolytische Ambozeptoren und Komplement untersucht worden. Einmal wurden beide Stoffe bestrahlt, das andere Mal nur der Ambozeptor. Die Bestrahlungsdosis betrug: 23 cm Ab-

stand, $2^1/_2$ Milliampere, kein Filter, 30 Min. Also eine ganz erhebliche Strahlenbelastung, zumal sie dem Ambozeptor täglich zuteil wurde,



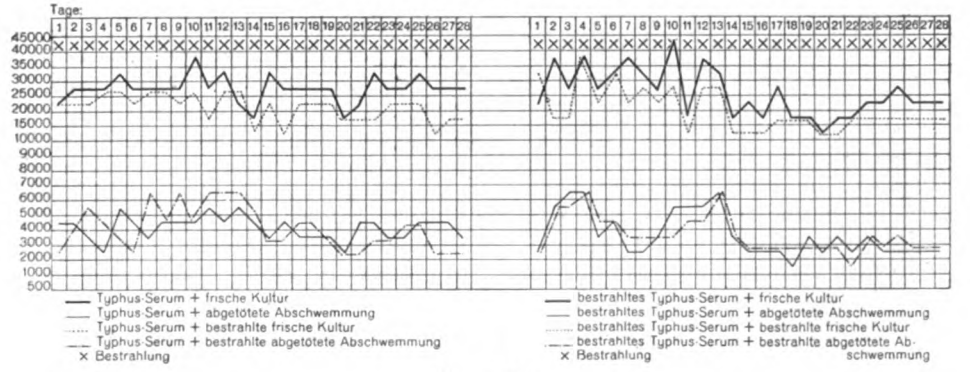
Kurve 8.

während das täglich frisch gewonnene Komplement naturgemäß nur je einmal bestrahlt wurde (Kurve 7).



Kurve 9.

Das Ergebnis ist wenig deutlich. Bei Bestrahlung beider Stoffe liegt der Titer anfangs etwas höher als bei den Kontrollen, bei nur



Kurve 10.

allein bestrahltem Ambozeptor wird man einen nennenswerten Unterschied nicht annehmen können. Worauf die Zunahme der hämolytischen Kraft beruht, steht ganz dahin; vielleicht kann man an Aviditätssteigerung denken. Jedenfalls wird man auch hier nicht mehr sagen können als: non liquet.

Bei der Bestrahlung agglutinierender Seren sind die Versuche mit Paratyphus A und B und mit Typhus-Serum vorgenommen worden. Die Titerbestimmung wurde jeweils mit frischer und mit wärmegetöteter Kultur ausgeführt. Einmal wurde nur das lebende oder tote Antigen bestrahlt, das andere Mal nur das Serum. Die Titerbestimmung erfolgte in der üblichen makroskopischen Weise (Kurve 8, 9, 10).

Wie die Schaulinien ganz deutlich erkennen lassen, ist bei dieser Versuchsanordnung ein Strahleneinfluß nicht erkennbar — trotz der gewaltigen Mengen strahlender Energie, die den Agglutininen und den Bakterien zugewendet worden ist. Klar tritt nur die Folge der Erwärmung des Antigens hervor, indem die abgetöteten Bakterien schwächer als die lebenden agglutiniert worden sind. Das tritt sehr stark beim Typhusbazillus hervor, weniger beim Paratyphus A-Bazillus und noch weniger beim Paratyphus B-Bazillus.

Ueberblickt man die Gesamtergebnisse der Strahlenwirkung, so kann man einen deutlichen Einfluß auf die Bildung der Antikörper oder auf die fertigen Antikörper außerhalb des Warmblüters nicht feststellen. Nur die hämolytischen Ambozeptoren bilden sich unter Strahleneinfluß in viel größeren Mengen (oder stärkerer Avidität?), und zwar am stärksten durch Einwirkung von Röntgenstrahlen, etwas schwächer durch Ultraviolettlichteinwirkung.

Da diese Beobachtungen an 36 Kaninchen gewonnen sind — nicht gerechnet diejenigen, die vorzeitig eingegangen sind — so darf man sich wohl mit Recht darauf stützen, so sehr willkommen weitere Untersuchungen zur Sicherung der Erfahrungen sind. Worin das merkwürdig verschiedene Verhalten des Körpers begründet ist, daß er bei der Behandlung mit Typhusantigen so ganz anders sich verhält als bei Einspritzung artfremder roter Blutzellen, bleibt einstweilen dunkel. Altbekannt ist ja freilich die Tatsache, daß der Kaninchenkörper Typhusagglutinine weniger leicht und willig liefert als hämolytische Hammelblutambozeptoren. Man kann sich immerhin vorstellen, daß der Reiz der fremden Blutzellen gewissermaßen dem physiologischen Betriebe der lebenden Zelle weniger fern steht als der Reiz der Typhusbazillen. Dann könnte man sich denken, daß der Leistungskern im Ersatz gerade dieser, durch die Blutzellen besetzten Seitenketten auf physiologischem Wege und zu physiologischen Zwecken dauernd geübt ist. Man könnte sich aber auch denken, daß der Leistungskern einfach mehr Seitenketten gegenüber artfremden Blutzellen hat als gegenüber Typhuszellen, und daß der Untergang der zahlreichen Seitenketten sich durch raschen Ersatz, also das Erscheinen zahlreicher neuer, freier Seitenketten — hämolytischer Ambozeptoren — zu erkennen gibt. In beiden Fällen würde die Strahlenwirkung einen annähernd physiologischen Vorgang unterstützen. Vielleicht handelt es sich aber auch um einen sehr verschiedenen chemischen Aufbau bei Agglutininen und Ambozeptoren.

Da unter dem Lichteinfluß 3—4mal so hohe Titer erreicht werden, als bei Gruppenimmunisierungen von Kaninchen durchschnittlich erreicht werden, liegt es nahe, dies Verfahren praktisch anzuwenden, zumal es sehr einfach ist. Man wird sich dabei zweckmäßig der Röntgenstrahlen bedienen, weil die Tiere dann nicht enthaart zu werden brauchen und die Tiere die Enthaarung schlecht vertragen.

Nachdruck verboten.

Vergleichende Untersuchungen über die Konservierung agglutinierender Sera mit Karbolglyzerin, Glyzerin und Yatren.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamts.]

Von **Kurt Herzberg.**

Die gelegentliche Wiederkehr von Aenderungsvorschlägen für die Konservierung diagnostischer Sera läßt erkennen, daß wir zurzeit über keine Präparation verfügen, die der Serumbewahrung in vollkommener Weise gerecht wird. Ein Serumkonservierungsmittel soll möglichst folgende Bedingungen erfüllen: es darf den Agglutinationstiter auf die Dauer eines Jahres nicht nachteilig beeinflussen, es muß das Wachstum von Mikroorganismen in den Seren verhindern und soll schließlich Farbe und Klarheit des Serums nicht verändern. Als vierte Forderung wird von Hinz erhoben, daß der konservierende Zusatz nicht giftig sein darf. Damit sind die Ansprüche, die der Abnehmer an die Seren stellt, im wesentlichen erschöpft. Der Serumhersteller hat noch den Wunsch, daß das Konservierungsmittel handlich und billig ist. Es ist gewiß erstaunlich, daß bei der großen Zahl von Substanzen, die zur Haltbarmachung organischer Substrate geeignet ist, bislang die angeführten Ansprüche nicht restlos erfüllt werden konnten, mit anderen Worten, daß ein Präparat, welches gleichzeitig den Agglutinationstiter erhält, Keimfreiheit der Seren garantiert, sie klar läßt und dabei den Vorzug der Billigkeit hat, uns nicht zur Verfügung steht.

Auf Grund der Untersuchungen von Haendel und Hüne werden im Reichsgesundheitsamt die agglutinierenden Seren mit Karbolglyzerin konserviert. Der Zusatz geschieht in der Weise, daß zu 90 ccm steril entnommenen und zentrifugierten Serums 10 ccm Karbolglyzerin (Acid. carbol. liquef. 5,5; Glycerin pur. 20,0; Aqua dest. ad 100) gegeben werden. Haendel und Hüne konnten zeigen, daß der Karbolglyzerinzusatz die Agglutinationstiter von Cholera-, Typhus-, Paratyphus- und Ruhrseren, also derjenigen, die in der Praxis am häufigsten verlangt werden, während der Dauer von mindestens 2 Jahren entweder unverändert läßt oder doch nur geringfügig abschwächt. Dieses vorteilhafte Verhalten des Karbolglyzerins wird noch dadurch erhöht, daß der Zusatz von 0,5 Proz. Phenol zur Wachstumsunterdrückung von banalen Verunreinigungen ausreicht. Als unangenehm muß dagegen die schleimig-flockige Trübung empfunden werden, die der Karbolglyzerinzusatz bei vielen Seren nach Tagen oder Wochen bedingt. Eine Titerveränderung ruft indes diese Flockung nach den Untersuchungen von Haendel und Hüne nicht hervor.

Verwendet man das Glyzerin allein zur Konservierung, so behält das Serum seine ursprüngliche Farbe und Durchsichtigkeit bei. Im Verhältnis von 1 Teil Serum zu 1 Teil Glyzerin wurde dieses Verfahren zuerst von Reiner Müller angewandt, später von Bitter empfohlen. Die gute Bewahrung der Farbe und Klarheit des Serums im Gegensatz zur Mehrzahl der mit Karbol versetzten Sera ist so

eindrucksvoll, daß man das Glyzerin als Konservierungsmittel par excellence bezeichnen müßte, wenn es den übrigen an ein Konservierungsmittel zu stellenden Anforderungen in gleicher Weise gerecht würde. Der Agglutinationstiter hält sich nach Bitter bei den glyzerinisierten Typhus-, Paratyphus- und Enteritis-Seren 2—3 Jahre lang auf gleicher Höhe. Sterilität bzw. Wachstumshemmung konnte er dagegen nicht bei allen Seren erzielen. Wenn auch Bakterien nicht zur Entwicklung kamen, so vermochten sich doch gelegentlich Schimmelpilze, insbesondere Angehörige der Gruppe Aspergillus, anzusiedeln. Eine Titerveränderung trat aber hierdurch nicht ein. Berdnikow bestätigt die Vorzüge des Glyzerins.

Neuerdings ist das Yatren wiederholt zur Serumkonservierung empfohlen worden. Von Hinz zuerst auf Grund seiner Ungiftigkeit und seiner guten bakteriziden Eigenschaften angewendet und vorgeschlagen, hat dieses Präparat bei der Nachuntersuchung (Arendt) für agglutinierende Seren günstige Befunde ergeben.

Die geschilderten 3 Konservierungsmethoden wurden im Laufe der letzten 2 Jahre an einer größeren Zahl der im Reichsgesundheitsamt zur Abgabe gelangenden agglutinierenden Seren einer vergleichenden Prüfung unterzogen.

Methode: Das rohe, steril entnommene Serum wurde zentrifugiert, in 3 Portionen verteilt und je eine Portion mit den genannten Konservierungsmitteln folgendermaßen versetzt:

1) 9,0 ccm Serum + 1,0 ccm Karbolglyzerin,
2) 10 ccm Serum + 10,0 ccm Glyzerin,
3) 10 ccm Serum + 0,25 g Yatren pur.

Die Aufbewahrung geschah in braunen Flaschen, die durch Korken und Paraffinierung abgeschlossen waren. Die Aufbewahrungstemperatur schwankte zwischen 10 und 20° C. Zur Prüfung kamen folgende Seren: Meningokokken (2 Pferdeseren), Proteus X_{19} (2 Kaninchenseren), Suipestifer (1 Kaninchenserum), Erzindjan (1 Kaninchenserum), Paratyphus B monovalent (1 Eselserum), Paratyphus B polyvalent (2 Eselseren), Typhus (2 Eselseren), Ruhr Shiga-Kruse (2 Eselseren), Ruhr y (3 Eselseren).

Insgesamt waren also 16 Seren mit je 3 Konservierungsmitteln angesetzt worden. Die Untersuchung erfolgte alle 3 Monate. Sie konnte während des letzten Jahres mit Hilfe des von Gildemeister und Herzberg angegebenen Lampen-Agglutinoskops, das bekanntlich über eine konstante Lichtquelle verfügt, zu einer verläßlich vergleichenden gemacht werden. Gewisse Schwierigkeiten machten sich bei der Schlußbeurteilung der Befunde insofern geltend, als ja die Agglutination nicht nur von dem Serum, sondern in weitem Maße von der Beschaffenheit des Stammes abhängig ist, dessen Agglutinabilität bekanntlich selbst in kurzen Zeiträumen sehr wechseln kann. So konnten gelegentlich nach einer Reihe von Monaten höhere Titer festgestellt werden als beim Ansetzen des Serums. Daraus geht hervor, daß der Vergleich zwischen Anfangs- und Endtiter vielleicht weniger maßgeblich sein darf als der Vergleich der Karbolglyzerin-, Glyzerin- und Yatrensera untereinander in bezug auf dasselbe Datum. Seren, die bei der ersten Ablesung 1:6400 agglutinierten, zeigten beispielsweise nach einem halben Jahr 1:1600, nach 2 Jahren aber 1:12800. Es ergab sich schließlich, daß eine Verschiedenheit zwischen Anfangs- und Endtiter nach 2 Jahren trotz Verwendung desselben

Stammes zur Agglutination bei allen Konservierungsarten häufiger festzustellen war als eine Uebereinstimmung.

Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse läßt sich sagen, daß nur geringe Verschiedenheiten in dem agglutinatorischen Verhalten der nach den 3 Methoden konservierten Seren nachgewiesen werden konnten. Zeigte das auf die eine Art konservierte Serum gegenüber dem letztmalig festgestellten Titer eine Ab- oder Zunahme, so war dieser Unterschied meist auch bei den anderen beiden Seren zu konstatieren. Im allgemeinen gab sich aber eine leichte Ueberlegenheit des Glyzerins kund, das meist eine Verdünnung weiter + reagierte als die mit Karbolglyzerin und Yatren konservierten Sera. Die beiden letztgenannten Konservierungsmittel erwiesen sich für die Erhaltung des Agglutinationstiters als gleichwertig.

Sterilitätsverhältnisse und Aussehen der Sera:

Die Karbolglyzerin- und Yatrensera waren sämtlich bakteriell steril. Hefen und Pilze wurden nicht gefunden. Die Glyzerinsera wiesen in 3 Flaschen reichliche Schimmelbildung auf (Aspergillus), Bakterien waren in ihnen nicht nachweisbar. Serumfarbe und Klarheit war bei den Glyzerinseren mit Ausnahme der 3 durch Schimmelbildung verunreinigten unverändert gut erhalten, die Yatrensera waren sämtlich völlig klar, aber stark dunkelgelb gefärbt, die Karbolsera waren zu 50 Proz. klar und farblich fast unverändert, zur anderen Hälfte schleimigflockig getrübt.

Die Aufbewahrungsflaschen waren nur alle 3 Monate geöffnet worden. Ist eine häufigere Entnahme notwendig, so lassen sich auch in karbolglyzerinisierten Seren Mikroorganismen nachweisen. Von 21 solcher öfter benutzten und mit Karbolglyzerin versetzten Seren waren 7 geringfügig bakterienhaltig (grampositive und negative Kokken, Stäbchen, Sarcinen). Diese Bakterien waren brauchbare Objekte, um die desinfizierende Kraft der 3 Konservierungsmittel im Serum zu untersuchen. Sie wurde so geprüft, daß etwa je eine Million Keime in je 3 ccm Eselserum, dem die Konservierungsmittel in den folgenden Konzentrationen zugesetzt waren, suspendiert wurde: Yatren 2,5 und 4 Proz., Glyzerin 50 Proz., Karbolglyzerin 0,5 Proz. Untersuchung des Keimgehalts nach 1, 2, 3 und 4mal 24 Std. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur. Keimvermehrung trat nirgends ein. Glyzerin schadete den Keimen sehr wenig, Karbolglyzerin 0,5 Proz. und Yatren 2,5 Proz. z. T. erheblich, noch etwas stärker Yatren 4 Proz.[1]). Der Versuch entspricht den Verhältnissen der Praxis, in der es gelegentlich zu bakteriellen Verunreinigungen der Seren durch häufiges Oeffnen der Vorratsflaschen kommen kann. Es ergibt sich aus ihm, daß man mit Yatren und Karbolglyzerin eine zufällige Infektion sicher hemmt und für Agglutinationszwecke brauchbare Seren behält.

Zusammenfassend lassen sich die 3 Konservierungsmittel in ihren Eigenschaften folgendermaßen kennzeichnen. Der Agglutinationstiter wird am besten vom Glyzerin bewahrt, Karbolglyzerin und Yatren erniedrigen ihn im Durchschnitt im gleichen Ausmaß, und zwar

1) Die Angabe, daß das Yatren sich bei Zimmertemperatur nur zu etwa 1 Proz. im Serum löse, ist unrichtig. Zwar bleibt bei einem Zusatz über 1 Proz. ein großer Teil des Yatrens ungelöst, doch gehen noch bei höheren Konzentrationen gewisse Mengen fortschreitend in Lösung. Dies kann grob sowohl an der Zunahme der Farbintensität als auch an der höheren Desinfektionskraft erkannt werden.

im Vergleich zum Glyzerin um eine Verdünnung (z. B. 6400:3200). Man würde also das Glyzerin, das allein das Serum auch in Farbe und Klarheit nicht verändert, vorschlagen müssen, wenn es eine Keimvermehrung sicher hemmen würde. Dies scheint zwar gegenüber Kokken, Sarcinen usw., nicht aber gegenüber Schimmelpilzen der Fall zu sein. Dieser Nachteil läßt gegenüber seiner Verwendung Bedenken entstehen, die größer sind als jene, welche durch die geringfügige Titerherabsetzung seitens des Karbolglyzerins und Yatrens hervorgerufen werden. Bezüglich der mit 0,5 Proz. Karbolglyzerin und 2,5 Proz. Yatren versetzten Sera ergab sich, daß sie das Bakterien- und das Schimmelpilzwachstum unterdrücken. Auch das Agglutinationsvermögen der mit Yatren und Karbolglyzerin konservierten Sera zeigte durchschnittlich keine Unterschiede, so daß man beide Mittel als wachstumshemmend und agglutinationserhaltend gleichwertig empfehlen kann. Zuweilen werden jedoch karbolkonservierte Sera wegen der oft recht starken schleimig-trüben Niederschläge vom Abnehmer beanstandet, so daß es gerechtfertigt erscheinen würde, statt des Karbolglyzerins das Yatren anzuwenden. Es wird aber ebenfalls Serumabnehmer geben, welche die gelbe Farbe der yatrenisierten Sera ablehnen. Sie ist in den Verdünnungen 1:40 und 1:80 intensiv, was z. B. bei Meningokokkenagglutinationen nicht angenehm ist, und sie läßt sich noch in der Verdünnung 1:400 wahrnehmen. Die Forderung, daß das Konservierungsmittel die Farbe und Klarheit der Seren unverändert lassen soll, wird also sowohl vom Yatren als auch vom Karbolglyzerin nur zur Hälfte erfüllt, während das Glyzerin hier wieder voll genügt. Aus all dem geht hervor, daß weder das Karbolglyzerin noch das Glyzerin noch das Yatren den Ansprüchen genügen, die an ein vollkommenes Serumkonservierungsmittel zu stellen sind. Alle drei Präparate haben Nachteile, und die Vorteile des einen vor dem anderen sind nicht so groß, daß man Instituten, die vielleicht mit Yatren gute Erfahrungen gemacht haben, zum Karbolglyzerin raten wird und umgekehrt. Es bleibt daher nur zu entscheiden, ob die Nachteile des einen Präparates die des anderen überwiegen. Ein solcher Nachteil wurde in den Untersuchungsergebnissen beim Glyzerin darin gesehen, daß es eine Vermehrung von Schimmelpilzen zuläßt. Die Beanstandungen, die am Karbolglyzerin und Yatren erhoben werden können (Farb- bzw. Klarheitsveränderungen), sind demgegenüber weniger bedenklich. Die Nachteile dieser beiden Präparate dürften sich die Wage halten, und es ist Geschmackssache, welches Präparat der Serumhersteller zur Konservierung benutzt. Eine Lösung der Serumkonservierungsfrage ist weder mit dem Karbolglyzerin noch mit dem Yatren erreicht; es muß ein Serumkonservierungsmittel gefunden werden, das dem Glyzerin an Titer-, Farbe- und Klarheiterhaltendem Vermögen nicht nachsteht, darüber hinaus aber die Fähigkeit hat, die Entwicklung bakterieller Verunreinigungen zu unterdrücken.

Zusammenfassung.

Vergleichende Untersuchungen über die Konservierung diagnostischer Sera ergaben, daß von den zurzeit zur Konservierung von agglutinierenden Seren benutzten Präparaten (Glyzerin, Karbolglyzerin, Yatren) das Karbolglyzerin und das Yatren der Summe der in der Praxis

zu stellenden Anforderungen (Erhaltung des Titers, Unterdrückung des Bakterien- und Schimmelpilzwachstums, Erhaltung von Farbe und Klarheit) am nächsten kommen. Beide Präparate können mit ungefähr gleichem Erfolge angewendet werden. In vollkommener Weise wird das Serum weder vom Karbolglyzerin noch vom Yatren bewahrt.

Literatur.

Arendt [Inaug.-Diss.] Hannover 1922. — Berdnikow, Compt. rend. Soc. de Biol. T. 89. 1923. p. 713. — Bitter, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 87. 1922. S. 560. — Gildemeister u. Herzberg, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 91. 1924. S. 536. — Haendel u. Hüne, Arb. aus dem Kais. Gesundheitsamt. Bd. 29. 1908. S. 382. — Hinz, Berl. tierärztl. Woch. 1921. S. 148. — Ders., Ebenda 1922. S. 419.

Nachdruck verboten.

Ueber Komplementverstärkung.

Von Prof. **M. Mühlmann**, Baku (Rußland).

Es gibt wohl kaum einen Serumbestandteil, dessen Erforschung mehr Aufmerksamkeit auf sich gelenkt hat, als das Komplement. Neuerdings hat Klopstock[1]) die ursprüngliche Annahme Ehrlichs, wonach das Komplement einen Bestandteil des Serums darstellt, welcher durch Vermittelung des Ambozeptors auf das Antigen einwirkt, abgelehnt, indem er darin bloß eine bestimmte Zustandsform des kolloidalen Systems des Serums sieht. Mit einer solchen Auffassung der Verhältnisse scheinen die Ergebnisse meiner Versuche, welche ich seit 1911 angestellt habe, in Widerspruch zu stehen. Ich habe sie nicht veröffentlicht, weil sie ihrerzeits nicht abgeschlossen waren; da ich aber nicht voraussehe, wann ich wieder darauf zurückkomme, so gestatte ich mir, in Anbetracht der dabei erwiesenen, für die Praxis nützlichen Ergebnisse, sie jetzt in Kürze mitzuteilen.

Bekanntlich enthält das Blutserum mancher Tiere entweder gar kein Komplement, oder in so geringer Menge, daß es sich beim hämolytischen Versuche nicht nachweisen läßt, so das Pferdeblut, Rinderblut, Hammelblut, Taubenblut, manches Menschenblut. Von den gebräuchlichen Versuchstieren besitzt das Meerschweinchenblutserum vielleicht die größte Komplementenergie. Aber auch dieses Komplement hat für die praktische Anwendung den Nachteil, daß es, wie Komplemente überhaupt, labil ist; Gefrieren oder die Salzsättigung nach Friedberger schützt es vor der Zerstörung nur auf beschränkte Zeit. Auf die Dauer ist es bis jetzt Niemandem gelungen, das Komplement zu verstärken oder zu stabilisieren. Von Nolf[2]), Müller[3]), Sweet[4]) wird angegeben, daß es durch Injektion von Blutplasma, Bouillon, Aleuronatbrei, Pepton, Kasein, Nuklein, physiol. Kochsalzlösung, Staphylokokken, Terpentinöl und andere Mittel, wie sie Sachs[5]) aufzählt, gelingt, die Komplementenergie des Serums

1) Klopstock, Dtsch. med. Woch. 1924. Nr. 51.
2) Nolf, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900.
3) Müller, Centralbl. f. Bakt. 1901.
4) Sweet, ebenda 1904.
5) Sachs, Kolle u. Wassermanns Handbuch. Bd. 2.

zu erhöhen. Dabei handelt es sich aber nur um passagere Reizwirkungen.

Vom Ehrlichschen Standpunkte ausgehend, versuchte ich, das Komplement durch Immunisierung der Tiere dauerhafter zu machen. Abweichend vom üblichen Modus, verwandte ich aber einmalige große Injektionsdosen. Die Versuche wurden an Kaninchen und Meerschweinchen ausgeführt.

Da das natürliche Komplement der Tiere großen Schwankungen unterworfen ist, so wurde bei jedem zu immunisierenden Tiere zuerst die Stärke seines Komplementes geprüft. Diese Kontrollprüfung stellt die Hauptschwierigkeit der Versuche dar, da die vorherige Blutentnahme das Tier für weitere Versuche schädigt. Ich versuchte, diese Schwierigkeit durch die Blutentnahme aus der Ohrvene zu umgehen, was aber nicht in allen Fällen möglich war, da die zu prüfende Blutmenge, besonders bei Kaninchen, deren Komplement überhaupt schwächer als dasjenige der Meerschweinchen ist, für den Versuch nicht ausreicht. Deshalb sah ich in den meisten Fällen von einer Kontrolle bei demselben Kaninchen, welches zum Versuch diente, ab und stellte mehrere Komplementprüfungen am Serum normaler Kaninchen an: die geringste Komplementdosis des Kaninchenserums mit 50 AE erwies sich gleich 0,3. In allen Fällen wurden auch Kontrollen angestellt, um die hämolytische Wirkung des Komplements ohne Ambozeptorzusatz auszuschließen.

Einer Reihe von Meerschweinchen (4) und Kaninchen (8) wurde Staphylococcus aureus-Kulturen subkutan injiziert, und zwar wurden große Bakterienmengen, eine $^1/_2$ bis ganze Agarkultur eingeführt, so daß innerhalb einiger Tage Abszeßbildung an der Injektionsstelle eintrat. Innerhalb 2—3 Wochen konnte der Abszeß Walnußgröße erreichen und nach etwa 1 Monat begann er sich mit Narbenbildung zurückzubilden. Die Prüfung des Komplementgehaltes erfolgte im Laufe der Versuchszeit mehrmals. Als Ambozeptor diente in allen unseren Versuchen Kaninchen-Hammelblutserum, von welchem Hammelblutkörperchen sensibilisiert wurden. Das Ergebnis war die Steigerung des Komplementgehaltes der Meerschweinchen von 0.05 auf 0,012, also um 4 mal. Dabei wurde auch eine bedeutende Stabilität des Komplementes erreicht, indem es seine Stärke innerhalb 25 Tagen bei Aufbewahrung im Eisschrank im flüssigen Zustande behielt. Bei Kaninchen konnte 0,1 ccm Serum, welches sonst keine Komplementwirkung aufwies, im Stadium der Narbenbildung 16 AE verankern. Bei einem Kaninchen konnte 3 Wochen nach der Injektion 0,05 ccm Serum 1 AE verankern! Die Staphylococcusinjektion bewirkte in diesem Falle eine Komplementverstärkung, die selbst bei Meerschweinchen nicht häufig gefunden wird. Auch in diesem letzten Falle war die Stabilität bedeutend, indem noch nach 13tägiger Aufbewahrung 0,1 ccm Komplement mit 1,6 AE Hämolyse bewirkte.

3 Kaninchen wurde je $^1/_2$ Agarkultur von B. coli subkutan mit analogem Erfolg injiziert. Abszeßbildung trat bei 1 Kaninchen ein; die Komplementverstärkung war bei diesem Tier auch am größten: 0,1 ccm Komplement mit 1 AE — komplette Hämolyse.

Eine Komplementverstärkung erfolgte auch nach Injektion von Tuberculosis bovinus-Bazillen in die Bauchhöhle (0,1 ccm einer

Bouillonkultur): die Komplementprüfung erfolgte 9 Tage und 7 Wochen nach der Injektion: 0,1 ccm K. mit 1 AE. — Hämolyse!

Eine ebensolche Komplementverstärkung wurde innerhalb 14 Tagen bei 1 Kaninchen nach der Injektion von 1,0 ccm Dysenterietoxin in die Ohrvene erreicht (Näheres über die Stärke meines Dysenterietoxins siehe in meiner Arbeit in Zieglers Beiträge, Bd. 57. 1914).

1 Meerschweinchen von 500 g wurde tuberkuloseverdächtiges Exsudat in die Bauchhöhle injiziert. Das nach 27 Tagen getötete Tier zeigte keine Tuberkulose. Vor dem Versuche war der Ambozeptortiter mit seinem Komplement 1:2000, 19 Tage nach der Injektion, ebenso wie nach dem Tode 1:3000. Nach 13tägiger Aufbewahrung konnte noch 0,05 K. mit 1 A.E. Hämolyse erzeugen.

An tuberkulös infizierten Meerschweinchen konnte ich dagegen regelmäßig eine Komplementdeprimierung feststellen. Je nach Steigerung oder Verminderung der Komplementenergie konnte ich sogar erraten, ob die geprüfte Impfung tuberkulös war oder nicht. Es wäre interessant, die Prüfung des Komplementes an tuberkulösen Individuen zu untersuchen, da vielleicht daraus praktische Schlußfolgerungen gezogen werden könnten.

Was die Deutung der Ergebnisse unserer Untersuchung anbelangt, so sei zunächst darauf hingewiesen, daß in den Staphylokokkus-Versuchen nicht etwa eine hämolytische Wirkung des Staphylotoxins erfolgte, wie die schon erwähnten Kontrollversuche, welche mein Mitarbeiter, Dr. Barg, mehrmals wiederholte, zeigten. Letzterer prüfte auch die Wirkung von Cholerakulturinokulationen, die ja hämotoxische Eigenschaften besitzen. Das Serum der Kaninchen, welchen diese Kulturen subkutan injiziert wurden, zeigte keine hämolytische Wirkung. Schließlich will ich noch Untersuchungen erwähnen, welche Dr. Barg bezüglich des hämatologischen Bildes und der Alkaleszenz des Blutes der Versuchstiere ausführte und in denen außer einer gewissen Leukozytose keine nennenswerten Ergebnisse erzielt wurden.

Ich glaubte, die Ergebnisse meiner Untersuchungen am einfachsten mittels der Ehrlichschen Seitenkettentheorie erklären zu können. Da Antikörper aus Ambozeptor und Komplement bestehen, so steigt mit der Immunisierung die Stärke sowohl des Ambozeptors als des Komplementes, welche dabei stets in einem gewissen quantitativen Verhältnis zueinander stehe. Wir konnten hochgradige Komplementenergie an Kaninchen nachweisen, welche spezifisches Hämolysin enthielten, als wir ihr Komplement an einem anderen hämolytischen System prüften. Ebenso zeigte hochgradige Komplementstärke das gegen Diphtherie immunisierte Kaninchen (allerdings konnte ich in meinen Notizen keine näheren Angaben über die Art, in welcher ich diese Immunisierung durchgeführt hatte, finden). Die Steigerung der Komplementenergie geht Hand in Hand mit der Stärke der Immunitätsphänomene im Blutserum. Es ist ja bekannt, daß, um dieselbe Quantität Blutkörperchen aufzulösen, je mehr Ambozeptor angewandt wird, um so weniger Komplement hinzuzusetzen ist, und umgekehrt. Diese Regel gilt sowohl für das natürliche Komplement, wie auch für das künstlich gesteigerte. Die Einwirkung des Komplementes auf den kolloidalen Zustand des Serums besagt nichts gegen die Deutung desselben als einen Immunkörper. Die Tatsache, daß Ambozeptor spezifisch und Komplement unspezifisch ist, spricht bloß dafür, daß beide infolge der Wirkung verschiedener chemischer Bestandteile des Anti-

gens entstehen, und zwar sprechen die von uns erhobenen Tatsachen dafür, daß Komplement einen Antieiweißimmunkörper überhaupt darstellt, was mit der Ehrlichschen Auffassung übereinstimmt, daß im Komplement ein proteolytisches Ferment anzusehen ist. Die Annahme des Charakters des Komplementes als einen Immunkörper erklärt vielleicht auch die Tatsache, weshalb dasselbe im Blute junger Tiere fehlt.

Was die Herkunft des Komplementes anbetrifft, so sprechen die Ergebnisse unserer Untersuchung zugunsten der Anschauung Buchners und Metschnikoffs, wonach das Komplement den Leukozyten ihre Entstehung verdankt, da in unseren Fällen Leukozytose bzw. starker Leukozytenzerfall eintrat.

Meine Versuche führten jedenfalls zu einem wichtigen praktischen Ergebnis für das Komplementablenkungsverfahren, namentlich für die Wassermannsche Reaktion. Der dadurch gewiesene Weg der Komplementverstärkung und Komplementstabilisierung wird wohl zu merklicher Materialersparnis führen. Ich konnte mit einem und demselben Komplement 1:40 mehrere Wochen die Wassermannsche Reaktion anstellen! Vor dem neuerdings empfohlenen Trockenkomplement „Pharmagans", das für Russen auch jetzt noch nur schwer prompt zu erhalten ist, hat unser Komplement somit den Vorzug, daß es nicht nur haltbar, sondern auch kräftiger ist. Da die Bereitung desselben bekannt ist, ist wohl zu hoffen, daß weitere Untersuchungen zu noch größeren Fortschritten sowohl in der Steigerung der Kraft des Komplementes, als auch in der Erkenntnis seiner Natur führen werden.

Nachdruck verboten.

Anwendung alkoholfreier Organextrakte zur Ausflockungsreaktion mit Zerebrospinalflüssigkeit.

[Aus dem Laboratorium des klinischen Instituts zu Kiew (Prof. Dr. med. M. Beniasch).]

Von Assistent **David Lerner.**

Vorliegende Arbeit ist das Resultat der Anwendung zur Reaktion mit Zerebrospinalflüssigkeit der von Prof. Beniasch und mir ausgearbeiteten Methode der Ausflockungsseroreaktion bei Syphilis.

Die Darstellung der physisch-chemischen Grundlagen der Methode und die Bereitungsweise der alkoholfreien Lipoidemulsion der Organe ist in unserer Grundarbeit gegeben[1]). Hier will ich mich mit der Beschreibung der Anordnung der Reaktion mit Liquor und der Titrierungsmethode der Emulsion für dieselbe begnügen.

---

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. S. 352.

Anordnung der Reaktion.

Ein kleines Reagenzglas wird mit 1 ccm inaktivierter Spinalflüssigkeit und 0,3 ccm alkoholfreier Lipoidemulsion festgestellten Titers beschickt, und das Gemisch, nach tüchtigem Durchschütteln 6—7 Min. lang zentrifugiert (elektrische Zentrifuge mit wenigstens 2000 Touren pro Minute). (Trübe Flüssigkeiten müssen vor Anordnung der Reaktion durch Filtrierung oder Zentrifugierung vom Niederschlag getrennt werden). Gemische mit negativen Flüssigkeiten bleiben unverändert; in positiven Fällen bildet sich am Boden oder im Gemisch selber eine größere oder kleinere Membran bei völliger oder partieller Klärung des Gemisches. Beim Schütteln steigt die Membran nach oben und zerfällt in Flocken. Das spezifische Präzipitat ist leicht von zufälligen Niederschlägen, die sich bei Anwesenheit fremdartiger Verunreinigungen in der Spinalflüssigkeit bilden können, zu unterscheiden, da letztere keine Membran, sondern einen amorphen Niederschlag bilden, welcher beim Schütteln trichterartig in Trübung zerfließt. Es kann jedoch bei schwach-positiver Reaktion ein solcher Niederschlag den Ausfall derselben maskieren. Solche Fälle habe ich mehrmals bei Versuchen mit Zerebrospinalflüssigkeit beobachtet, welche größere Quantitäten hämolysierten Blutes oder fremdartige Verunreinigungen enthielten, oder mit nicht genügend frischen, durch Bakterien getrübten Flüssigkeiten. Bei Anordnung der Reaktion mit solchen Flüssigkeiten nach der Methode von Meinicke war die Beurteilung der Resultate größtenteils sehr schwierig.

Im Gegensatz zu der Reaktion mit Blutserum, wo sich die Membran an der Oberfläche des Gemisches bildet, sammelt sich in Gemischen mit Zerebrospinalflüssigkeit das Präzipitat am Boden. Dies ist wahrscheinlich durch das im Vergleich mit dem Blutserum geringere spezifische Gewicht der Zerebrospinalflüssigkeit bedingt. Es gelingt nicht die Bildung der Membran an der Flüssigkeitsoberfläche durch Steigerung ihres spezifischen Gewichts mittels Zusatz konzentrierter Kochsalzlösung zu erzielen, da das Kochsalz in konzentrierter Lösung die Sensibilität der Reaktion ungünstig beeinflußt.

In Fällen stark-positiver Reaktion mit 1,0 ccm Spinalflüssigkeit wird eine genauere Bestimmung des Grades der Reaktion durch Anordnung eines ergänzenden Versuches mit 0,5 und 0,2 ccm Flüssigkeit erzielt, was 0,25 und 0,1 ccm Flüssigkeit bei Anordnung der Wa.R. nach der Titrationsmethode Hauptmann und Hösslis entspricht. Stark reagierende Flüssigkeiten geben auch mit 0,2 ccm eine stark-positive Reaktion (++++).

Der Grad der Reaktion bietet eine Reihe Abstufungen dar; von der stark-positiven, welche durch Bildung einer dicken Membran, die beim Schütteln in zahlreiche große in einer vollkommen klaren Flüssigkeit suspendierte Flocken zerfällt, zum Ausdruck kommt — bis zur schwach-positiven Reaktion (+), bei welcher die Flüssigkeit trüb bleibt, die Membran schwach ausgesprochen ist und beim Schütteln der Flüssigkeit spärliche, kleine Klümpchen bildet (die Beurteilung der Reaktion geschieht mit unbewaffnetem Auge).

Titration der Emulsion.

Das Titrieren der Emulsion wird mit mehreren Spinalflüssigkeiten ausgeführt: stark positiven, partiell positiven und negativen. In 6

Reagenzgläschen wird von jeder Flüssigkeit je 1,0 ccm gegossen und je 0,6, 0,4, 0,3, 0,24 0,2 und 0,17 vorläufig mit physiologischer Lösung doppelt verdünnter Emulsion zugesetzt; vom 2. Reagenzglas ab wird die Emulsion mit physiologischer Lösung bis zum Volumen 0,6 ccm aufgefüllt. Die so erlangten Verdünnungen der Emulsion steigen in einer arithmetischen Progression von 1:2 bis 1:7. Der Titer entspricht derjenigen Verdünnung, bei welcher die Reaktion maximal ausfällt. Der Titer der Emulsion ist von Zeit zu Zeit zu kontrollieren.

Die Ausflockungsreaktion mit Zerebrospinalflüssigkeit habe ich nach der beschriebenen Methode in 126 Fällen ausgeführt. Parallel wurden Versuche mit WaR. und DM. angeordnet; in einem Teil der Fälle wurde die Nonne-Apeltsche Reaktion, die Eiweißmenge und Lymphozytenzahl bestimmt. In 50 Fällen wurde nach Wa., DM. und unserer Methode) auch das Blut der Kranken untersucht. Bei 14 Kranken, welche mit intralumbalen Salvarsaninjektionen behandelt wurden (K. Karischen-Pawlowska), wurde die Spinalflüssigkeit vor und während der Behandlung wiederholt untersucht.

Tabelle Nr. I bietet eine Zusammenstellung der mit unserer Reaktion (B.L.R.) erzielten Resultate mit denjenigen der WaR. und DM. Die WaR. wurde mit 0,5, 0,25, 0,1 ccm Flüssigkeit ausgeführt.

Tabelle I.

Im Ganzen sind 126 Spinalflüssigkeiten untersucht. Davon 120 (95,2 Proz.) eindeutige Resultate nach allen 3 Methoden: 40mal positiv, 80mal negativ.

	Zahl der eindeutigen Resultate	Proz.	Zahl der nicht übereinstimmenden Resultate	Proz.
WaR + BLR +	42	96,8 Proz.	.	.
WaR — BLR —	80			
WaR + BLR —	.	.	3	2,4 Proz.
WaR — BLR +	.	.	1	0,8 „
DM + BLR +	40	96,0 Proz.	.	.
DM — BLR —	81			
DM + BLR —	.	.	2	1,6 Proz.
DM — BLR +	.	.	3	2,4 „
WaR + DM +	42	97,6 Proz.	.	.
WaR — DM —	81			
WaR + DM —	.	.	3	2,4 Proz.
WaR — DM +	.	.	—	.

Was die Intensität der Reaktion anbetrifft, so ergaben alle 3 Methoden, trotz größerer oder geringerer Variationen in den einzelnen Fällen, doch im ganzen gleichwertige Resultate.

Aus der Tabelle ist zu ersehen; daß die Methode B.L.R. der DM. in der Sensibilität nicht nachsteht. Es wäre hierbei zu bemerken, daß die Zusammenstellung der Gesamtzahl der nach zwei verschiedenen Methoden übereinstimmenden Resultate, wie dies bei den Autoren der Brauch ist, keine genaue Vorstellung vom Grade der Sensibilität einer Methode gibt; es wäre richtig, nur die Zahl der nach den einzelnen Methoden erhaltenen positiven Reaktionen zu vergleichen, bei bewiesenem spezifischen Charakter der Reaktion in jedem einzelnen Falle.

Eine solche Art der Verwertung würde uns einigermaßen der einzig genauen (wäre sie ausführbar) Beurteilungsweise des Sensibilitätsgrades einer Methode näher bringen; dies wäre ein Vergleich der Anzahl der Fälle von Vorhandensein syphilitischer Infektion im Organismus mit der Anzahl der in dieser Gruppe erlangten positiven Reaktionen. In meinem Material ist die Gesamtanzahl der Fälle mit positiver Reaktion nach allen 3 Methoden 46; die Zahl der Fälle mit positivem Ausfall der WaR. = 45 (97,8 Proz.), der DM. = 42 (91,3 Proz.), unserer Methode = 43 (93,4 Proz.).

Eine Frage von nicht geringer Wichtigkeit ist der Grad der Spezifizität einer Methode.

Da mir bei meinen Forschungen ein klinisches Material vorwiegend stationären Charakters zur Verfügung stand, hatte ich in der Mehrzahl der Fälle die Möglichkeit, die Resultate der Reaktion mit der klinischen Diagnose zu vergleichen; in den übrigen Fällen diente zur Kontrolle der Spezifizität des positiven Ausfalls der Reaktion der ganze Komplex der Angaben, welche bei Untersuchung der Flüssigkeit in verschiedenen Richtungen erlangt wurden.

Eine positive Reaktion nicht spezifischen Charakters wurde in keinem Falle festgestellt.

Ich erachte es für interessant, sich eingehender mit dem in der Tabelle verzeichneten Falle zu beschäftigen, wo das Resultat der Reaktion nach der Methode B.L.R. positiv, nach WaR. und DM. negativ ausfiel. Es ist dies ein Fall von progressiver Paralyse, wo die Spinalflüssigkeit für die Untersuchung nach einer Behandlung mit interlumbalen Salvarsaninjektionen entnommen wurde. In Tabelle II ist die ganze Reihe der Untersuchungen dargestellt, welche mit der Zerebrospinalflüssigkeit dieses Kranken zu verschiedenen Zeiten ausgeführt wurden.

Tabelle II.

	WaR	DM	BLR	R. Nonne-Appelt	Lymphozyten	Serum	
						WaR	DM
Vor der Behandlung	0,1 ++++	++++	nicht angewandt worden	+++	398/3	++++	++++
Während des I. Behandlungskursus	0,5 +	+	+++	+++	126/3	.	.
des II.	0,5 —	—	+++	++	99/3	.	.
des III.	0,5 —	—	—	—	Zahl nicht festgestellt	.	.

Diese Angaben zeugen von dem spezifischen Charakter der positiven Reaktion, welche in diesem Falle die Methode BL. ergab: es gelang mit dieser Methode die syphilogenen Eigenschaften der Spinalflüssigkeit darzutun in einem Stadium des Prozesses, in welchem die WaR. und DM. bereits zu keinem positiven Resultate führten.

Als Endergebnis sehen wir, daß die Methode der Anwendung alkoholfreier Lipoidemulsion zur Ausflockungsreaktion mit Zerebrospinalflüssigkeit ebenso brauchbar ist, wie zur Reaktion mit Blutserum. Diese Methode hat im Vergleich zur DM.-Reaktion (wie auch anderen Ausflockungsreaktionen) den Vorteil, eine schnellere Beurteilung der Reaktion zu erlauben, ohne ihr weder im Sinne der Sensibilität, noch im Sinne der Spezifizität nachzustehen.

Den Vorstehern der Abteilung für Geisteskranke und der venerologischen Abteilung des Krankenhauses — K. Karuschew und N. Goldobin, welche mir liebenswürdig das Material ihrer Abteilungen zur Verfügung stellten und die notwendige Anleitung in der klinischen Auswahl der Fälle erteilten, bringe ich auch hier meinen aufrichtigen Dank dar.

Inhalt.

Aoki, K., u. **Sakai, K.,** Ueber von Hogcholerabazillen einerseits, von Paratyphus A-Bazillen andererseits schwer differenzierbare, in Japan vorkommende Paratyphusbazillen, S. 152.

Baumatz, Szaja, Ueber den Bakteriengehalt des Magens und des Dünndarms vom gesunden Meerschweinchen, S. 191.

Buschke u. **Kroó,** Erwiderung auf die Arbeit von J. Tomioka: „Experimenteller Beitrag zur Frage der Immunität bei Recurrens und ihrer Beeinflussung durch die Salvarsantherapie" in Bd. 92. Nr. 1—3 des Centralbl. f. Bakt. etc., S. 188.

Gundel, M., Ueber das Vorkommen von Pneumokokken in der Mundhöhle, S. 202.

Herzberg, Kurt, Experimentelle Untersuchungen über Pocken-Neurolapine, S. 211.

—, —, Vergleichende Untersuchungen über die Konservierung agglutinierender Sera mit Karbolglyzerin, Glyzerin und Yatren, S. 245.

Hucker, G. J., A Study of the Characters of Primary Importance in the Differentiation of the Micrococci, S. 109.

—, —, Studies on the Serological Relationships of the Species of Micrococci, S. 123.

Ihle, J E. W., Verzeichnis der Cylicostomum-Arten der Equiden, mit Bemerkungen über einzelne Spezies. Mit 4 Abbildungen im Text, S. 227.

Kollath, Werner, Vitaminähnliche Substanzen in ihrer Wirkung auf das Wachstum der Influenzabazillen (Baz. Pfeiffer). II Mitteilung: Die Wachstumsbeeinflussung der Influenzabazillen durch fremde Bakterien und ihre Zusammenhänge mit der Biologie des Influenzabazillus. Mit 2 Tafeln, S. 158.

—, —, u. **Quast, Gerhard,** Eine vereinfachte Methode für Anaërobenzüchtung. Mit 1 Abbildung im Text, S. 181.

Konrich, Beitrag zur Wirkung von Röntgen- und Ultravioletttstrahlen auf Antikörper in vivo und vitro. Mit 10 Kurven im Text, S. 237.

Lerner, David, Anwendung alkoholfreier Organextrakte zur Ausflockungsreaktion mit Zerebrospinalflüssigkeit, S. 252.

Munter, Hans, Zur Komplementdosierung bei der Wassermannschen Reaktion, S. 183.

Mühlmann, M., Ueber Komplementverstärkung, S. 249.

Müller, Reiner, Die Schleimwälle der Paratyphus B-Kolonien. Mit 1 Abbildung im Text, S. 147.

Poppi, Umberto, Die Wirkung des Radiums auf die Kuhpockenlymphe. Vorläufige Mitteilung, S. 224.

Schuurman, C. J., Der Bakteriophage, ein lebender Organismus, S. 97.

Sierakowski, Stanislaw, Ueber mit Typhusserum agglutinierende Proteus-Stämme, S. 137.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5337

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 95. Heft 5/6.

Ausgegeben am 10. Juli 1925.

Nachdruck verboten.

Zur Kenntnis bakteriophagenähnlicher Erscheinungen.

Fleckenartige Aufhellungen in Sproßpilzrasen (Monilia).

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Köln (Professor Dr. Reiner Müller).]

Von Dr. **Curt Sonnenschein.**

Mit 1 Tafel.

Vor kurzem berichtete K. L. Pesch über „Milzbrand-Pseudobakteriophagen", Aufhellungen im Bazillenrasen einer alten Milzbrandkultur. Die Lichtbilder Peschs lassen in dem Rasen viele verschieden große, scharf umschriebene, rundliche und, weil durchsichtiger, lochartig aussehende Flecken deutlich erkennen. Trotz einer gewissen Aehnlichkeit mit den nach d'Herelle durch Bakteriophagen hervorgerufenen „Taches vierges" konnte Pesch zeigen, daß diese eigenartige Aufhellung nicht eine bakteriophage, sondern eine Variationserscheinung ist: in dem anfangs gleichmäßigen, ziemlich undurchsichtigen Milzbrandrasen entstehen durch das Auftreten einer in durchsichtigeren Kolonien wachsenden Variante jene lochartigen Aufhellungen.

Inzwischen ist noch eine ähnliche Mitteilung von H. Andervont und Charles E. Simon, wenigstens im Referat (1925), „Ueber die Entstehung aufgehellter Zonen (pellucid areas) auf Agarkulturen gewisser sporenbildender Bakterien", bekannt geworden. Bemerkenswert erscheint mir, daß diese Aufhellungen ebenfalls bei einem Sporenbildner, Bac. cereus, entstanden, der nach Lehmann und Neumann dem Bac. Ellenbachensis und dem Milzbrandbazillus nahesteht. Eine Abtrennung des wirkenden Prinzips von den Bazillen wurde weder durch Filtration noch durch Waschung und Zentrifugieren erzielt.

Ueber eine Beobachtung, die wohl auch zu dieser Gruppe bakteriophagenähnlicher Erscheinungen gehört, berichtete W. Seiffert 1922: In der Plattenaussaat eines Staphylococcus albus, der durch seine ungleichmäßige Farbstoffbildung aufgefallen war, begannen am 3.—4. Tage sowohl in dem zusammenhängenden Teil des Impfabstrichs, wie in den Einzelkolonien hier und da Stellen einzutrocknen, bis sie bei oberflächlicher Betrachtung so gut wie verschwunden schienen. Obwohl das Bild den bakteriophagischen Löchern ziemlich entsprach, gelang weder in Bouillon noch auf Agarnährböden irgendeine Uebertragung dieser Erscheinungen auf gesunde Bakterien. Als Erklärung nimmt S. eine intrabakterielle Störung an.

Noch immer harrt das Bakteriophagenproblem einer Alle befriedigenden Deutung, die die vielen Beobachtungen über echte Bakteriophagenwirkung hinreichend sicher erklärt, und die bisher so weit auseinandergehenden Auffassungen vereinigen könnte. Bei der Fülle der Mit-

teilungen und Untersuchungen über die Erscheinungsformen der Bakteriophagenwirkung erscheint es angebracht, darauf hinzuweisen, daß manche Forscher einen Beweis entweder gar nicht versucht oder aber nicht erbracht haben dafür, daß die von ihnen beobachteten und untersuchten „Bakteriophagen", die sie oft zu weitgehenden Schlußfolgerungen veranlaßten, überhaupt Bakteriophagenwirkungen im Sinne d'Herelles gewesen sind! Schärfere Abgrenzung des eigentlichen Bakteriophagengebietes von äußerlich ähnlich aussehenden Erscheinungen, die jetzt naturgemäß mehr beachtet werden, ist dringend erwünscht zur genaueren Kenntnis und Abtrennbarkeit der echten Bakteriophagenwirkung.

Eine Beobachtung, die den eingangs erwähnten Veröffentlichungen bakteriophagenähnlicher Erscheinungen anscheinend nahesteht, scheint mir deshalb beachtenswert.

Besser als jede Beschreibung werden einige Lichtbilder meine Beobachtung und deren Aehnlichkeit mit bekannten Bildern echter Bakteriophagie, insbesondere der „taches vierges", verdeutlichen. Wir erhielten einen Tupferabstrich eines diphtherieverdächtigen Mandelbelags zur Untersuchung auf Diphtheriebakterien (Buch-Nr. 179327). Neben spärlich vorhandenen Diphtheriebakterien fand ich auf den Loeffler-Serum- und Blutagarkulturen reichlich zunächst soorpilzartige Sproßpilze, die ich dann reinzüchtete. Die genauere systematische Einreihung und Benennung möchte ich mir hier versagen, zumal da auf diesem Gebiete die Nomenklatur noch nicht feststeht und noch dauernd wechselt. Jedenfalls aber ist es nicht der gewöhnliche Albicans-Sproßpilz, den wir bei klinischem Soor zu finden gewohnt sind, sondern eine, wenigstens beim Menschen, seltenere Monilia-Art. Je zwei 7 und 10 Tage alte Riesenkolonien, nach punktförmiger Beimpfung des Nährbodens bei Zimmerwärme (etwa 17° C) gewachsen, sind in den Fig. 1—2 in natürlicher Größe wiedergegeben. Besonders an der 7 Tage-Kolonie (1a und 2a) ist deutlich die tiefer liegende Mitte mit matttrockener Oberfläche und der dickere feuchte Randwulst, der sich scharf gegen die Mitte absetzt, zu erkennen. Bei der 10 Tage-Kultur (1b und 2b) ist der Randwall etwas flacher, trockener und außen und innen weniger scharf begrenzt. Der Sproßpilz wächst auf den gewöhnlichen bakteriologischen Nährböden: Nähragar, Endoagar, Blutagar usw., bei Zimmerwärme (um 17—18°) üppiger und rascher als bei 37°. Mit diesem Moniliastamm beimpfte Lackmus-Zuckerröhrchen mit je 1 Proz. Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Laktose und Maltose blieben während 5tägigen Wachstums sowohl bei Zimmerwärme, als bei 37° unverändert, eine Rötung trat nicht ein. 2 weiße Mäuse, denen in 1 ccm physiologischer NaCl je 1 Oese Agarplattenkultur dieser Monilia unter die Rückenhaut eingespritzt wurde, waren nach 60 Tagen am Leben. Die Kultur selbst erwies sich bei regelmäßiger Untersuchung, ungefärbt unter Deckglas und auch nach verschiedenen Methoden gefärbt, stets als rein, auch auf Platten- und in Bouillonkulturen fand ich nie eine Verunreinigung durch Bakterien oder andere Pilze.

Eine nach der Reinzüchtung beimpfte Endo-Platte zeigte zunächst in den ersten 2 Tagen eine gleichmäßig matte Oberfläche des Wachstumrasens. Vom 3. Tage ab traten, ähnlich wie von W. Seiffert für seine Staphylokokken angegeben, in dem den Aussaatstrichen entlang gewachsenen Rasen hier und da, an dichter bewachsenen Stellen zuerst. deutlich als Flecken imponierende Veränderungen auf. Im durch-

fallenden Licht erschien der sonst undurchsichtige Rasen etwas aufgehellt, also mehr durchscheinend. Im auffallenden Licht zeigten die Flecken, im Gegensatz zu der umgebenden matten Kulturoberfläche, einen feuchten Glanz. Dieses Stadium, am 4. Wachstumstage, zeigen die Fig. 3 und 4 in annähernd natürlicher Größe. Auf Bild 3, aufgenommen in sehr schräg auffallender Beleuchtung, heben sich die durchscheinenden Flecken gegen den schwarzen Hintergrund dunkel von dem umgebenden Rasen ab; dagegen im spiegelnd auffallenden Lichte (Fig. 4) tritt durch den Lichtreflex der feuchte Glanz der Flecken, im Vergleich zur trockenen und matten Oberfläche der Umgebung, deutlich hervor. Die Aufnahmen 5 und 6 zeigen einen Ausschnitt aus derselben Kultur wie 3 und 4, aber bei ungefähr doppelter Vergrößerung. Beim Aelterwerden der Kulturen nahm die Zahl und Größe der Flecken zu. Diese Eigentümlichkeit der Fleckenbildung behielt der Stamm auch in weiteren Fortzüchtungskulturen bei.

Sowohl in der Art des Auftretens, der zeitlichen Entwicklung, dem Beginn meist an dichter bewachsenen Stellen, der Größe und dem Hervortreten der veränderten Oberflächenbeschaffenheit, besteht eine gewisse Aehnlichkeit zu den bekannten schillernden Flecken mancher Kulturen von Bacterium pyocyaneum. Ueber das Auftreten dieser auffallenden, unregelmäßigen Flecken in Pyocyaneusrasen, meist mit metallischem Oberflächenglanz dieser oft lochartig vertieften Stellen, ist schon wiederholt berichtet und eine Deutung derselben versucht worden! Die Anordnung, das ganze Auftreten der Flecken in dem beschriebenen Monilia-Rasen und bei Pyocyaneus-Glanzbildnern zeigt auch im Aussehen eine solche Aehnlichkeit, so daß mir, zu einem Vergleiche, die Wiedergabe der Lichtbilder 7 und 8 zweckmäßig erscheint. Bild 7 zeigt eine mit derselben Technik wie bei Bild 3 aufgenommene, 24 Std. alte Pyocyaneus-Kultur. Der Stamm war ganz frisch aus dem Abstrich einer Gallenblasenoperationsfistel reingezüchtet worden (Buch-Nr. 179692). Deutlich sind bei dieser schräg auffallenden Beleuchtung dunkel erscheinenden Flecken im Kulturrasen zu sehen. Die genau wie im Bild 4 im spiegelnden Licht hergestellte Aufnahme 8 läßt, auffallend ähnlich wie dort, nur hier bei einer Pyocyaneus-Kultur, den Glanz der Fleckenoberfläche hervortreten. Ueber echte Pyocyaneus-Bakteriophagen berichten Pesch u. Sonnenschein, Klin. Woch. 1925.

Versuche, aus Bouillonkulturen dieses Monilia-Stammes verschiedenen Alters, bei Zimmerwärme oder bei 37° gewachsen, durch Filtration einen lytischen Stoff für diesen oder für 10 andere darauf untersuchte Monilia-Stämme zu erhalten, blieben ohne Erfolg. Ebensowenig gelang es, durch Abimpfen von den feuchtglänzenden Partien selbst und Ueberimpfung auf andere Monilia-Kulturen eine einfache Uebertragung zu erreichen. Versuche, aus den Flecken eine Variante herauszuzüchten, die in Kulturen nur eine feuchtglänzende Kolonienoberfläche zeigte, gelangen nicht. Die vorgenommenen Abimpfungen ergaben vielmehr wieder, mehr oder weniger vollkommen, ein ähnliches Bild wie bei der beschriebenen Erstkultur: Zunächst nur Wachstum mit völlig matter Oberfläche, dann nachträglich darin auftretend die fleckenartigen Stellen mit feuchter Oberfläche. Am besten trat die Erscheinung auf Endo-Platten, weniger gut auf Blutagar und Levinthal-Platten, noch weniger gut auf gewöhnlichem Nähragar auf.

Es mag sein, daß diese Flecken nur eine Wachstumseigentümlichkeit dieser Monilia-Art ist, der bisher keine Beachtung geschenkt wurde, die aber jetzt durch ihre Aehnlichkeit mit Kulturrasenflecken und Aufhellungen durch Bakteriophagen in diesem Zusammenhang sofort auffallen mußte. 2 weitere Monilia-Stämme (Buch-Nr. 174910 und 173491), die obigem Monilia-Stamme auch sonst nahe verwandt sein dürften, zeigten diese Erscheinung auch, allerdings nicht so typisch wie jener. Auch hier gelang eine Abspaltung von Varianten nicht. Inwieweit das Auftreten der Flecken, das übrigens durch Uebergang von zunächst bei Zimmerwärme gewachsenen Kulturen zu 37° begünstigt wird, mit den bekannten Autolyse-Erscheinungen echter Hefen durch Endoenzyme (Endotrypase), worauf noch v. Gruber und auch W. Seiffert vor kurzem hinwiesen, im Zusammenhang steht, ließ sich bis jetzt nicht feststellen.

Das nachträgliche Auftreten, meist an den dichter bewachsenen Stellen, entlang den Impfstrichen, die feuchte Oberfläche usw., ließen zunächst einen derartigen Zusammenhang vermuten. Aber durch Färbung von Zellen aus dem normalen Rasen einerseits und aus den feuchten Flecken andererseits ließ sich hierfür kein zutreffender Befund erheben, nur die ohnehin makroskopisch sichtbare Feuchtigkeit der Kulturen im Bereich der Flecken gab den bei Färbepräparaten von manchen feucht oder schleimig wachsenden Bakterien bekannten Hof um die einzelnen Zellen oder Zellverbände. Auch die Färbung von Ausstrichpräparaten mit Doppelfärbung zur Darstellung der metachromatisch färbbaren Zellteile, sowohl mit Boraxmethylenblau-Chrysoidin, wie wir es zur Diphtheriekörnchenfärbung hier benutzten, worüber ich an anderer Stelle kürzlich berichtete (Münch. med. Woch. 1925), oder nach den noch kürzlich angegebenen Methoden von M. Gutstein oder auch J. Stoltenberg, ergaben keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Zellen der verschiedenen Herkunft. Auch mit einer örtlichen Bildung von Sporen war ein Zusammenhang nicht festzustellen.

Aehnlich wie Seiffert, glaube ich zunächst, ohne andere vielleicht noch nicht hinlänglich bekannte Möglichkeiten ausschließen zu können, für die Entstehung der dargestellten, meist scharf begrenzten fleckenartigen Aufhellungen in Monilia-Plattenausstrichen örtliche Störungen im normalen Wachstumsverlauf, sei es in der Zellvermehrung oder im Zellabbau mit dessen Folgeerscheinungen annehmen zu dürfen. Welche tiefere Ursache dieser Störung zugrunde liegt, ob lokale Erschöpfung des Nährbodens, Freiwerden von Endoenzymen und beginnende Selbstverdauung, Bildung widerstandsfähiger Zellformen, oder ob es sich, mit diesen Faktoren im Zusammenhang, um lokal und zeitlich beschränkte Standorts-Variabilität handelt, bleibt noch dahingestellt.

Eine Bakteriophagenwirkung kommt zur Erklärung der eigenartigen Erscheinung sicher nicht in Frage, es sei denn, daß man der Ansicht mancher Bakteriologen beipflichtet, die auch in der Bakteriophagenwirkung nur eine typische oder etwas atypische Autolyse mit deren Begleitvorgängen sehen zu dürfen glauben. Meine Beobachtung ist ein weiterer Beitrag zur Kenntnis bakteriophagenähnlicher Erscheinungen, und zeigt wieder, daß keineswegs allen umschriebenen Aufhellungen oder fleckenartigen Oberflächenveränderungen in Spalt- oder Sproßpilzkulturrasen eine Bakteriophagenwirkung im Sinne d'Herelles zugrunde liegt.

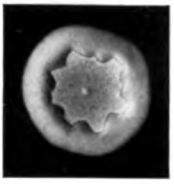


Fig. 1a.

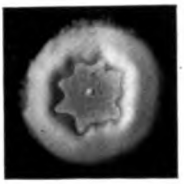


Fig. 1b.

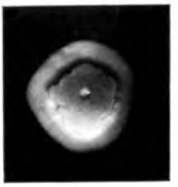


Fig. 2a.

Fig. 2b.

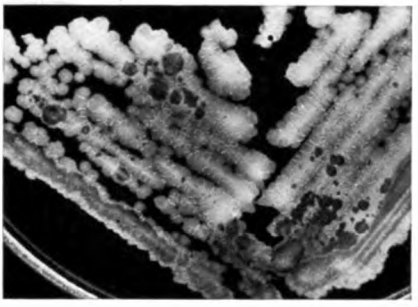


Fig. 3.

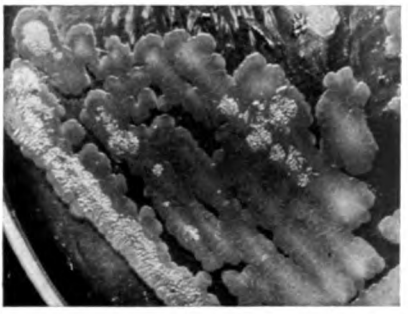


Fig. 4.

Fig. 5.

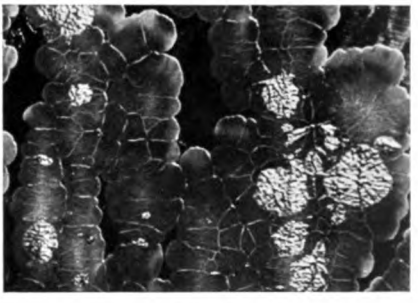


Fig. 6.

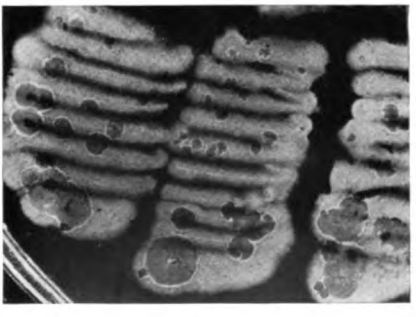


Fig. 7.

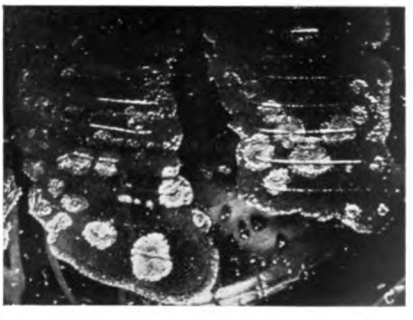


Fig. 8.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

THE LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS

Zusammenfassung.

1) Ein aus einem Diphtheriemandelabstrich gezüchteter Moniliastamm zeigt in der Oberflächenkultur scharf umschriebene aufgehellte Flecken. Die Oberfläche im Bereich der Flecken ist, im Gegensatz zur matt-trockenen der Umgebung, feucht-glänzend.

2) Es handelt sich, trotz einer gewissen Aehnlichkeit mit manchen Bildern beim d'Herelleschen Phänomen, nicht um eine Bakteriophagenwirkung.

Literatur.

Andervont, H., und Simon, Charles E., Americ. Journ. of Hyg. Vol. 4. 1924. p. 386; ref. Centralbl. f. Hyg. Bd. 9. 1925. S. 403. — v. Gruber, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 89. 1923. Beiheft 1 S. 205. — Gutstein, M., Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. S. 393. — Lehmann u. Neumann, Bakteriol. Diagnostik. 6. Aufl. 1920. S. 454. — Okamoto, F., Ztschr. f. Immunf. Bd. 42. 1925. S. 161. — Pesch, K. L., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. S. 525. — Pesch, K. L. u. Sonnenschein, Curt, Klin. Woch. 1925. — Seiffert, W., Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 89. 1923. Beih. S. 195; Dtsch. med. Woch. 1925. S. 350. — Sonnenschein, Curt, Münch. med. Woch. 1925. — Stoltenberg, Dtsch. med. Woch. 1924. S. 309.

Nachdruck verboten.

Neue Untersuchungen zur Kenntnis der Bakteriengeisseln[1]).

2. Mitteilung.

[Aus dem Hygienischen Institut (Direktor: Prof. Dr. C. Yokote) und dem Bakteriologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. M. Takenouchi) der Kaiserlichen Universität zu Tokio.]

Von Dr. **K. Yokota.**

Mit 1 Tafel.

Ueber die Beziehung zwischen Bakteriengeißeln und Bakterienagglutination.

Einteilung.

A. Die Beziehungen zwischen Geißeln und Agglutinabilität bei Typhusbazillen. 1) Resultate meiner ersten Mitteilung. — 2) Unterschiede in der Agglutinabilität der Bakterien aus dem Kondenswasser und der Oberfläche des Schrägagars. — 3) Die Verminderung der Agglutinabilität der Bakterien durch Schütteln. — 4) Die Agglutinabilität der Geißeln allein und die der Bakterienkörper. — 5) Ueber die „Geißelagglutination". — 6) Die Beziehungen der Geißeln zu den Agglutinabilitätsveränderungen der Bakterien. — 7) Zusammenfassung.

B. Die Beziehungen der Geißeln und der agglutinogenen Substanz bei Typhusbazillen. 1) Literatur über Ziliagglutinogen. — 2) Agglutininbildendes Vermögen der Geißeln. — 3) Differenzierung der Agglutinine bzw. der agglutinogenen Substanzen der Geißeln und des Bakterienkörpers. — 4) Die Beziehungen der Geißeln zur Agglutinabilität bzw. zur Antigenität bei Typhusbazillen. — 5) Die agglutino-

1) Vorgetragen unter Demonstration von Präparaten der „Geißelagglutination" am 2. April 1923 in der Versammlung der Japanischen Hygienischen Gesellschaft in Tokio.

gene Substanz der Typhusbazillen. Die Beziehungen der Geißeln zur Agglutination bei Typhusbazillen.

Einleitung.

Man hegte schon früher die Meinung, daß die Bakteriengeißeln zum Agglutinationsprozeß eine gewisse Beziehung haben. Einige Autoren behaupteten, daß die Geißeln auch agglutinogene Substanz besitzen. Viele Forscher aber erklären sich noch jetzt den Agglutinationsprozeß mit geringer Berücksichtigung der Geißeln.

Jedoch ist es allgemein bekannt, daß die Zilien auf die Geschwindigkeit der Agglutination oder auf den Ausflockungszustand der Bakterien einen Einfluß ausüben können. Ueber die Beziehungen zwischen den Geißeln und der Agglutination bei begeißelten Bakterien aber existiert meines Wissens noch kein beweiskräftiger Versuch.

Seit einigen Jahren studiere ich die Geißeln der Bakterien und habe schon einige der dabei erzielten Resultate veröffentlicht. In meiner letzten Mitteilung teilte ich auch einige Erfahrungen über die Geißeln mit, welche zur Agglutinationsreaktion eine gewisse Beziehung haben.

Seither setzte ich die Arbeit in dieser Richtung fort und konnte noch einige Tatsachen finden, die die Beziehungen zwischen den Geißeln und der Agglutination experimentell erklären sollen. Im folgenden will ich meine Ergebnisse darlegen.

A. Die Beziehungen zwischen Geisseln und Agglutinabilität bei Typhusbazillen.

1. Resultate meiner 1. Mitteilung.

In meiner 1. Mitteilung „Einige Erkenntnisse über die Eigenschaft der Bakteriengeißeln" teilte ich kurz folgendes mit:

1) Zerstörung der Geißeln durch 10 Min. langes Erhitzen auf 65° C führt gleichzeitig starke Verminderung der Agglutinabilität der Typhusbazillen herbei; es kommt zu verzögertem Reaktionseintritt und zur Bildung kleinerer Flocken als bei unerhitzten Bakterien. — 2) Härtung und Thermostabilisierung der Geißeln durch Formolzusatz mit nachfolgendem 1stünd. Erhitzen auf 80° C; bei der mit 1proz. Formol konservierten Typhusbazillenaufschwemmung verschwinden die Geißeln nicht, ebenso bleibt die eigentliche Agglutinabilität erhalten (Eisenberg, Volk und andere bemerkten schon, daß bei der mit 1proz. Formol konservierten Typhusbazillenaufschwemmung ihre Agglutinabilität durch Erwärmen auf 80° C nicht so stark geschädigt wird). — 3) Bei der Agglutination geißelloser Bakterien tritt normalerweise die Hypagglutinabilität durch Erhitzen auf 65° C nicht so deutlich ein. Ferner gehen Verschwinden der Geißeln und Hypagglutinabilität begeißelter Bakterien durch Erwärmen auf 65° C fast immer parallel.

Die 3 angeführten Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß die Geißeln bei dieser Hypagglutinabilität eine wesentliche Rolle spielen können.

2. Unterschiede der Agglutinabilität von Bakterien aus dem Kondenswasser und der Oberfläche des Schrägagars.

In meiner früheren Mitteilung „Ueber die Entstehung von spirochätenähnlichen Spiralkörperchen auf den gewöhnlichen Nährböden" hatte ich beschrieben, daß die Bakteriengeißeln sich länger und dicker im Kondenswasser als auf der Oberfläche des Schrägagars entwickeln.

Es wurde dort erwähnt, daß ein gewisser Unterschied zwischen den Agglutinabilitäten beider Kulturen bestehen müsse, wenn die Geißeln wirklich eine Beziehung zur Agglutinabilität der Bakterien haben.

Zu diesem Versuch benützte ich 2proz., schwach alkalischen, kondenswasserreichen Agaragarnährboden und kultivierte Typhusbazillen sorgfältig im Kondenswasser und auf der Oberfläche (18—24 Std. bei 33—35° C).

Zwei verschiedene Bakterienaufschwemmungen von beiden Kulturen wurden in gleicher Verdünnung hergestellt. Als Immunserum wurde

ein hochwertiges Serum von einem Pferde benutzt, welches mit abgetöteten, reichlich begeißelten Typhusbazillen mehrmals intravenös geimpft worden war. Ich benutzte zu den folgenden Untersuchungen meistenteils das Typhusimmunpferdeserum (s. Tabellen 1, 2, 3, 4 und 6).

Der Unterschied der beiden Agglutinabilitäten der Bakterien von dem Kondenswasser und der Oberfläche des gleichen Schrägagars ist folgender:

Tabelle I.

Unterschied der Agglutinabilität der Bakterien vom Kondenswasser und von der Oberfläche desselben Schrägagars.

tamm	Typhusbazillen 1								Typhusbazillen 2							
M.	Vom Kondenswasser				Von der Oberfläche				Vom Kondenswasser				Von der Oberfläche			
Z.	½	1	2	24	½	1	2	24	½	1	2	24	½	1	2	24
SV.	Agglutination															
200	++	+++	++++	++++	+	++	++	+++	++	+++	++++	++++	−	±	+	++
400	+++	+++	++++	++++	+	++	+++	++++	++	+++	++++	++++	±	⋕	++	+++
800	++	+++	++++	++++	+	++	++	+++	++	+++	++++	++++	±	⋕	+	+++
1 600	++	+++	+++	+++	⋕	+	++	++	++	++	+++	+++	±	⋕	+	++
3 200	++	+++	+++	+++	−	⋕	+	+	+	++	+++	+++	−	±	⋕	+
6 400	+	++	+++	+++	−	±	⋕	+	⋕	+	++	++	−	−	±	⋕
12 800	⋕	+	++	++	−	−	−	⋕	±	⋕	+	+	−	−	−	±
25 600	±	⋕	+	+	−	−	−	−	−	±	±	±	−	−	−	−
51 200	−	−	±	⋕	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
102 400	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Anmerkungen: Die Reaktion wurde nach ½, 1, 2 (im Brutschrank) und 24 Std. makroskopisch beobachtet. M. Versuchsmaterial. Z. Zeit. SV. Serumverdünnungsgrad.

Erklärung der Agglutinationswerte: ++++ sehr starke Flockung mit Sedimentierung. +++ starke Flockung. ++ mittelstarke Flockung. + schwache Flockung. ⋕ sehr schwache Flockung. ± zweifelhaft. − negativ.

Wie Tabelle 1 zeigt, wurden die Bazillen vom Kondenswasser stärker als die der Oberfläche desselben Nährbodens von gleichem Immunserum agglutiniert, ferner tritt bei ersteren die Reaktion schneller ein und geht mit gröberer Flockenbildung einher als bei letzteren.

Nach meinem Geißelfärbungsverfahren (s. Compt. Rend. Soc. de Biol. Bd. 90. No. 17) besitzen die Typhusbazillen aus dem Kondenswasser längere und dickere Geißeln, die von der Oberfläche desselben Nährbodens kürzere und dünnere Geißeln und auch relativ weniger.

Diese Versuche wurden wiederholt und ergaben stets das gleiche Resultat, daß nämlich die Unterschiede der Agglutinabilität, sowie der Geschwindigkeit der Reaktion und des Ausflockungszustandes beider Bakterien ganz übereinstimmend mit der Verschiedenheit der Anwesenheit und Beschaffenheit der Geißeln sind.

3. Die Verminderung der Agglutinabilität der Bakterien durch Schütteln.

Die Frage, ob die Geißeln zur Agglutinabilität begeißelter Bakterien wirklich nahe Beziehung haben, wird erst geklärt werden, wenn sich die Geißeln vom Bakterienkörper vollständig abtrennen lassen, ohne daß die Bazillenkörper selbst dabei geschädigt werden.

De Rossi stellte fest, daß die Geißeln in der Tat durch starkes Schütteln vom Bakterienkörper abgetrennt werden können; ich verwandte zu diesem Zwecke die vom Kondenswasser erhaltene Aufschwemmung der Typhusbazillen, welche gut entwickelte, zahlreiche Geißeln besitzen.

Ein Teil der Aufschwemmung wurde stark geschüttelt bis zur fast vollständigen Isolierung der Geißeln von den Bakterienkörpern (was nach meinem Geißelfärbungsverfahren färberisch festzustellen ist); ein anderer Teil diente als Kontrolle. Es wurde nun untersucht, ob die geschüttelte Aufschwemmung irgendeine Veränderung der Agglutinabilität gegenüber derjenigen der Kontrolle zeigte.

Tabelle II.

Agglutinabilitätsverminderungen durch Schütteln der vom Kondenswasser und der Oberfläche erhaltenen Typhusbazillen.

M.	Original-Bazillenaufschwemmung vom Kondenswasser				Geschüttelte Bazillenaufschwemmung vom K. W.				Original-Bazillenaufschwemmung von der Oberfläche des Schrägagars				Geschüttelte Bazillenaufschwemmung vom O. S.			
Z.	1/2	1	2	24	1/2	1	2	24	1/2	1	2	24	1/2	1	2	24
SV.	Agglutination															
200	++	+++	++++	++++	±	⧺	++	+++	+	++	+++	+++	±	+	+	++
400	+++	+++	++++	++++	±	+	++	+++	+	++	+++	++++	±	⧺	+	+++
800	++	+++	+++	++++	±	⧺	+	++	+	++	+++	+++	—	±	⧺	+
1 600	++	+++	+++	+++	—	—	⧺	+	⧺	+	++	+++	—	—	±	⧺
3 200	++	++	+++	+++	—	—	±	⧺	—	⧺	+	++	—	—	—	=
6 400	++	++	+++	+++	—	—	—	⧺	—	±	⧺	+	—	—	—	±
12 800	+	+	++	++	—	—	—	—	—	—	±	⧺	—	—	—	—
25 600	⧺	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
51 200	—	±	±	⧺	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
102 400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fl.	groß				etwas klein				ziemlich groß				klein			
G. R. E.	schnell				sehr langsam				langsam				sehr langsam			

Anmerkungen: M. Versuchsmaterial, Z. Zeit, S. V. Serumverdünnungsgrad, K. W. Kondenswasser, Fl. Flocken, G. R. E. Geschwindigkeit des Reaktionseintritts, v. S. O. von der Oberfläche des Schrägagars.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, zeigt die geschüttelte Aufschwemmung eine schwächere Agglutinabilität, sowie sehr deutlich verzögerten Eintritt der Agglutination und etwas kleinere Flocken als die Kontrolle. Nach Rossi soll durch die einfache Geißelabtrennung der Bakterien nur das Eintreten der Agglutination verzögert werden, ohne sie zu verhindern.

Ein Versuch, in dem die Verminderung der Agglutinabilität von frischer Typhusbazillenaufschwemmung nach einfachem Schütteln untersucht wurde, ist meines Wissens noch nicht beschrieben worden. Dabei konnte man aber vermuten, daß eine Substanz wie der sogenannte „Freie Rezeptor" von Neißer u. Shiga durch Schütteln aus den Geißeln frei werden und auch dadurch die Agglutinabilität sich abschwächen kann. Aber, wie in einem weiteren Versuche gezeigt wird, wird die Agglutinabilität der Bakterienkörperaufschwemmung, welche nach dem Schütteln durch Zentrifugieren von den Geißeln befreit wurde, noch schwächer als die der nur geschüttelten Aufschwemmung.

Ferner ist bemerkenswert, daß die Agglutinabilitätsverschiedenheit, welche normalerweise zwischen Kondenswasser und Schrägagarkultur

deutlich vorhanden ist, aber nach dem Schütteln von beiden, um die Abtrennung der Geißeln zu erzielen, ungefähr gleich wird.

Ich bin deshalb der Ansicht, daß die Hypagglutinabilität der geschüttelten Bakterienaufschwemmung meistens durch Abtrennung der Geißeln verursacht werden muß. Auch bestätigte ich dabei, wie Rossi schon behauptete, das verzögerte Auftreten der Agglutination nach Geißelabtrennung und außerdem eine geringe Verfeinerung der agglutinierten Flocken.

4. Die Agglutinabilität der Geißeln allein und die der Bakterienkörper.

Die Bakterien aus Kondenswasserkulturen wurden vorsichtig abzentrifugiert und in bestimmten Mengen von physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Alsdann wurde die so erhaltene Bakterienaufschwemmung im Schüttelapparat 1 Std. lang geschüttelt und durch 3—4std. starkes Zentrifugieren (5000 Umdrehungen per Minute) in „Geißelaufschwemmung" und Bakterienkörpersediment geteilt.

Die „Geißelaufschwemmung" ist eine beinahe vollkommen klare, durchsichtige und etwas zähe Flüssigkeit, in der die Untersuchung nach meiner Färbungsmethode außer zahlreichen Geißeln kaum die Anwesenheit von Bakterienkörpern aufweist. Die nach erstmaligem, starkem Zentrifugieren (1000 Umdrehungen per Minute) in einem Niederschlage agglomerierten Bakterienkörper wurden in zweckmäßigen Mengen von physiologischer NaCl-Lösung suspendiert.

Die so erhaltene „Bakterienkörperaufschwemmung", wenn sie so genannt werden darf, sieht homogen und dünnmilchig aus; die Färbung zeigt fast nur die geißellosen Bazillenkörper allein, es sind keine gefärbten Geißeln zu finden.

Ein Befund darüber, ob die Geißeln selbst eine eigentümliche Agglutinabilität haben, ist noch nie mitgeteilt worden. Wenngleich Rossi die Beziehungen der Geißeln zur Bakterienagglutination eingehend untersucht hat, gibt er jedoch nichts an über die Agglutinabilität der Geißeln allein. Früher wurden zum Studium der Geißeln hauptsächlich Bouillon- und Schrägagarkulturen, besonders äußerst frische Kulturen, beobachtet. Da aber im Kondenswasser des Agarnährbodens ein besonders günstiges Wachstum der Geißeln erfolgt, probierte ich einerseits, ob die oben erwähnte „Geißelaufschwemmung" von dem Pferdeimmunserum agglutiniert werden kann, andererseits ob die „Bakterienkörperaufschwemmung" auch gut von demselben Immunserum agglutiniert wird oder nicht.

Als Kontrolle dienten die Aufschwemmung der kompletten originalen Bakterien und die der geschüttelten Bakterien, wie folgt (siehe Tab. III, S. 266).

Wie aus der Tabelle (3) ersichtlich ist, tritt bei Einwirkung des Immunserums auf die Geißelaufschwemmung ein neuartiges Phänomen mit großer Deutlichkeit in Erscheinung: „eine Agglutination der Geißeln". Wie im nächsten Kapitel beschrieben wird, konnte ich feststellen, daß diese Erscheinung wirklich die Flockulation der Geißeln selbst gewesen ist. Daher bezeichne ich diese als „Geißelagglutination" (s. Tafelfigur 2).

Die Bakterienkörperaufschwemmung hingegen wurde von demselben Immunserum viel schwächer als die originale Bazillenaufschwem-

Tabelle III.

Agglutinabilität der abgetrennten Geißeln allein und der geißelbefreiten Bakterienkörper.

M.	Originalaufschwemmung vom Kondenswasser				Geschüttelte Aufschwemmung vom K. W.				Geißelaufschwemmung				Bakterienkörperaufschwemmung				
	1/2	1	2	24	1/2	1	2	24	1/2	1	2	24	1/2	1	2	4	24
SV.	Agglutination																
200	++	+++	++++	++++	±	+	++	+++	T +	T ++	+++	+++	−	+	+	+	++
400	+++	+++	++++	++++	±	+	++	+++	T +	T ++	+++	+++	−	#	+	++	+++
800	++	+++	+++	++++	−	#	+	++	T +	T ++	+++	+++	−	±	#	+	++
1 600	++	+++	+++	++++	−	−	#	+	T +	T ++	+++	+++	−	−	±	#	+
3 200	++	++	+++	+++	−	−	±	#	−	T +	++	++	−	−	−	±	#
6 400	+	++	++	+++	−	−	−	#	−	−	±	+	−	−	−	−	±
12 800	+	+	++	++	−	−	−	±	−	−	−	±	−	−	−	−	−
25 600	#	#	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
51 200	−	−	±	#	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
102 400	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Fl.	groß				etwas klein				sehr groß				klein				
G.R.E.	schnell				sehr langsam				langsam				sehr langsam				

mung agglutiniert, besonders auch schwächer als die geschüttelte Bazillenaufschwemmung; gleichzeitig wurde der Reaktionseintritt stark verzögert und die Flocken selbst sind klein, fest bodenliegend.

Der Befund ist ein auch makroskopisch bemerkbarer experimenteller Beweis, daß die Geißeln selbst eigene Agglutinabilität besitzen.

5. Ueber die „Geißelagglutination".

Es wurde nun versucht, die „Geißelagglutination" (wie ich sie zuerst genannt habe) besser zur Anschauung zu bringen.

Eine gewisse Zeit nach dem Vermischen der Geißelaufschwemmung und des Immunserums bei Brutschranktemperatur treten in der durchsichtigen Flüssigkeit einige eigenartige, weißliche, zarte, schwämmchenartige Flocken auf, welche bei schlechter Beleuchtung mit dem bloßen Auge nicht so leicht erkennbar sind. Wegen ihrer Leichtigkeit sinken die Flocken ganz langsam auf den Boden des Reagenzglases; sie sehen dann wie ein zartes weißliches Schwämmchen aus (s. Tafelfigur 1).

Nach meinem Geißelfärbungsverfahren stellte ich fest, daß die Flocken fast nur aus Geißeln bestehen (s. Tafelfigur 2).

Suspendiert man das mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschene agglutinierte Geißelsediment gleichmäßig (durch Schütteln) in neuer physiologischer Kochsalzlösung, so wird nach gewisser Zeit die „Geißelagglutination" wieder in Erscheinung treten.

Da das einmal agglutinierte Geißelsediment allein noch in der serumfreien Lösung von selbst agglutinabel ist, ist es klar, daß die Geißeln selbst durch das Immunserum sensibilisiert worden sind.

Wie ich oben angeführt habe, beobachtete man bisher nur die Geißeln von Bouillon- oder von Schrägagarkulturen; hier ist die Geißelagglutination noch nie zustande gekommen.

Sie ist dagegen leicht erkennbar bei Verwendung einer Geißelaufschwemmung, die von der sorgfältig kultivierten Kondenswasserkultur von Typhusbazillen, aber auch von Proteusbazillen, hergestellt wird.

Ferner kann, man dabei einige der Eigenschaften der Geißeln nachweisen, welche ich schon mitgeteilt hatte:

1. Verschwinden der Geißeln durch Erwärmen auf 65° C 10 Min. (sie werden in 5 Min. ziemlich deutlich zerstört, in 10 Min. sind sie fast vollständig verschwunden).

2. Härtung und Thermostabilisierung der Geißeln durch Formolzusatz etc.

Die auf 65° C 5 Min. lang erhitzte Geißelaufschwemmung wird vom Immunserum mit etwas kleineren Flocken agglutiniert als die nicht erhitzte. Mit der auf 65° C 10 Min. lang erhitzten, nicht formolierten Geißelaufschwemmung war keine Agglutinationserscheinung zu bemerken.

Auch werden die einmal agglutinierten Geißelflocken bei 65° C 5 Min. kleiner als sonst; sie verschwinden durch 65° C 10 Min. langes Erhitzen.

Weiterhin verliert eine Geißelaufschwemmung, die mit 1proz. Formol konserviert ist, und die bei 65° C über 10 Min. oder mit höherer Temperatur behandelt wird, ihre eigene Agglutinabilität nicht. Die sensibilisierten Geißelflocken, die in 1proz. Formol-Kochsalzlösung suspendiert wurden, verschwinden nicht durch Erhitzen auf 65° C bei 10 Min., sondern bleiben noch bei höherer Temperatur.

Wie bei diesen Versuchen makroskopisch zu beobachten ist, ist die eigene Agglutinabilität der Geißeln nur von der Anwesenheit der Geißelkörper selbst abhängig.

Damit ist klar, daß die Agglutinabilität der Geißeln etwas von der Bakterienagglutinabilität Verschiedenes sein muß.

Durch meine Geißelagglutination konnte ich eine Reihe wichtiger Eigenschaften der Geißeln nachweisen; ja, man kann das meiste der wichtigen Beziehungen von Geißeln zur Bakterienagglutination mit dieser einen Tatsache erklären.

Anmerkung: Die Geißelagglutination kommt bei Brüttemperatur langsam zustande, meist dagegen schneller bei 58—60° C im Wasserbad. Bei einigen Bakterienarten, z. B. bei Typhusbazillen, tritt, wie schon bekannt, die Agglutination schnell bei 60° C in Erscheinung; da sie bei der Bakterienkörperaufschwemmung bei 60° C nicht schneller zustande kommt, so müssen die Geißeln in dieser Geschwindigkeit der Agglutination irgendeine Rolle spielen.

Auch ist es bemerkenswert, daß bei Geißelagglutination die Erscheinung um so deutlicher wird, je größer die Menge von Geißelaufschwemmung und von Immunserum ist, und je konstanter die Geißelzahl. Ferner erwerben die agglutinierten Geißeln die Eigenschaft, sich beim Zentrifugieren leicht abzusetzen, und sind leicht färbbar.

6. Die Beziehungen der Geißeln zu den Agglutinabilitätsveränderungen der Bakterien (die durch Erwärmen verursacht werden können).

Nach der geschilderten Methode wurden die Geißel- und die Bakterienkörperaufschwemmung hergestellt. Die unveränderte Bakterienaufschwemmung diente als Kontrolle. Das Resultat der Agglutinabilitätsveränderungen von Geißel- und von Bakterienkörperaufschwemmung durch Erwärmen bei verschiedenen Temperaturen ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

Tabelle IV.

Agglutinabilitätsveränderungen durch Erwärmen bei verschiedenen Temperaturen von Geißeln und von Bakterienkörpern der Typhusbazillen.

M.	Originalaufschwemmung vom Kondens-wasser (Kontrolle)						„Geißelaufschwemmung"							„Bakterienkörper-aufschwemmung"							
T. u. Z.	VE	60	65	65	70	80	100	VE	60	65	65	70	80	100	VE	60	65	65	70	80	100
		1	5	10	1	1	2		1	5	10	1	1	2		1	5	10	1	1	2
SV.	Agglutination																				
200	g s	g s	m s	k L	k L	k L	k L	G s	G s	g s					k L	k L	k L	k L	k L		k L
400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+
800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+
1600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+
3200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+
6400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+
12 800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+
25 600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+
51 200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+
102 400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+
Fl.																					
G. R. E.																					

Erklärungen:

VE = Vor dem Erhitzen
T. u. Z. = Temperatur u. Zeit
65 5 = 65° C 5 Minuten
60 1 = 60° C 1 Stunde

g = groß, m = mittelgroß
s = ziemlich schnell
S = sehr schnell
L = sehr langsam
k = klein, G = sehr groß

Wie die Tabelle (IV) zeigt, vermindert sich bei der Kontrolle die Agglutinabilität bei 60° C 1 Std. kaum, bei 65° C 5 Min. ziemlich, bei 65° C 10 Min. sehr stark, weiter verändert sie sich nicht bis 70° C 1 Std., bei 80° C 1 Std. verliert sie sich zeitweise fast, stellt sich aber bis zu einem gewissen Grade wieder her bei 100° C 1—2 Std. Dabei ist es interessant, daß bei unter 65° C 10 Min. Erhitzen die Reaktion schnell mit gröberen Flocken, bei über 65° C bis 100° C 2 Std. Erhitzen die Reaktion langsam mit kleineren Flocken eintritt.

Bei der Geißelaufschwemmung schwächt sich die Agglutinabilität bei 60° C 1 Std. ganz wenig, bei 65° C 5 Min. ziemlich deutlich ab und bei 65° C 10 Min. verliert sie sich völlig und kommt bei höherer Temperatur bis 100° C 2 Std. nicht mehr zum Vorschein.

Bei der Bakterienkörperaufschwemmung bleibt die Agglutinabilität bei 60° C 1 Std. bis 70° C 1 Std. fast gleich, bei 80° C 1 Std. verliert sie sich einmal fast, stellt sich aber bei 100° C 2 Std. zu beinahe gleichem Grade wieder her wie bei der Kontrolle bei 100° C 2 Std.

Der Agglutinationswert der Bakterienaufschwemmung (Kontrolle), die mit dem Erwärmen auf 65° C 10 Min. behandelt wurde, ist fast derselbe wie derjenige der Bakterienkörperaufschwemmung, welche durch Erwärmen auf 65° C 10 Min. fast keine Veränderung gezeigt hat; ferner ist die Veränderungskurve der Agglutinabilität von beiden Aufschwemmungen von 70° C—100° C fast ganz gleich. Die Geißelaufschwemmung verliert ihre Agglutinabilität bei 65° C 10 Min. ganz und die Bakterienkörperaufschwemmung, von der die Geißeln abgetrennt wurden, zeigt bei dieser Temperatur fast keine Veränderung von ihrer Agglutinabilität im Vergleich zu der vor dem Erwärmen.

Der Versuch sichert experimentell die Tatsache, daß die Ursache der Hypagglutinabilität von Typhusbazillen bei 65° C hauptsächlich durch die Zerstörung der Geißeln gegeben ist, ohne durch eine Veränderung in den Bakterienkörpern bedingt zu sein.

Deshalb ist die Wiederherstellung der Agglutinabilität der Kontrolle bei 100° C nicht die volle Wiederherstellung derselben von kompletten Bakterien, sondern nur diejenige von Bakterienkörpern selbst, ohne daß diejenige von Geißeln daran teilnimmt.

Daraus ersieht man also, daß die Geißeln und die Bakterienkörper durch Erwärmen bei verschiedenen Temperaturen ganz andere Agglutinabilität zeigen und dadurch voneinander leicht unterschieden werden können.

7. Zusammenfassung.

Die Literatur, die über die Agglutinabilitätsverminderung von Typhusbazillen durch Erhitzen, sowie über die Ursache dieser Erscheinung ist recht zahlreich.

Die Anschauung von Porges u. a., daß die Verminderung bei 65° C auf einem einfachen Bakterien-Proteinzersetzungsprozeß begründet und durch Erhitzen auf 100° C fast völlig wiederherstellbar sei, ist vor allem vorherrschend.

Hingegen behaupteten Eisenberg u. Volk, daß die Zerstörung der sogenannten thermolabilen Gruppe (fällende oder funktionelle Gruppe) dabei eine wesentliche Rolle spielt.

Schon 1906 veröffentlichte Rossi eine Hypothese, daß die Behinderung der Agglutination bei 65° C erhitzter, gegeißelter Bakterien durch die eintretende Veränderung des Bakterienprotoplasmas und gleichzeitige Zerstörung der Geißeln verursacht sei.

Nach dem Resultat meiner Experimente glaube ich in ganz anderer Weise erklären zu können, was für eine Bedeutung die Geißeln für die Agglutinabilität bei Typhusbazillen haben. Die Anschauung von Porges usw. ist nicht richtig, denn die Wiederherstellung der Agglutinabilität bei 100° C ist nicht vollständig; die Agglutinabilität der Geißeln, welche bei 10 Min. langem Erhitzen auf 65° C verloren wird, ist

natürlich nie wiederherstellbar. Vielleicht mag die Anschauung nur für die Agglutinabilitätsveränderung der Bakterienkörper allein richtig sein.

Auch die Ansicht von Eisenberg usw. kann die Wiederherstellung der Agglutinabilität bei 100° C nicht erklären.

Die Hypothese Rossis liegt meiner Beobachtung näher. Leider hat er aber dafür keine beweisende Tatsache gehabt, da er eine Veränderung des bakteriellen Protoplasmas außer der Zerstörung der Geißeln annahm.

Nach meinen bisherigen Versuchen konnte ich feststellen, wie die Geißeln die Agglutinabilität der Typhusbazillen beeinflussen.

Die hier zuerst beschriebene „Geißelagglutination" erscheint besonders beweiskräftig.

Die Ergebnisse meiner Versuche über die Beziehungen der Geißeln zur Agglutinabilität der Typhusbazillen sind zusammengefaßt folgende:

Bei der Agglutination reichlich begeißelter Bakterien, z. B. bei Typhusbazillen, beruht ihre Agglutinabilitätsverminderung durch Erhitzen auf 65° C hauptsächlich auf der Zerstörung der Geißeln.

Also haben die Geißeln und die Bakterienkörper verschiedene Agglutinabilität durch verschiedene Temperaturen. Die Agglutinabilität der kompletten Bakterien ist durch ein Zusammenarbeiten von beiden Komponenten zu erklären.

Zweifellos spielen die Geißeln bei der Geschwindigkeit des Eintritts der Agglutination und beim Ausflockungszustand derselben eine wesentliche Rolle.

B. Die Beziehungen der Geißeln und der agglutinogenen Substanz bei Typhusbazillen.

1. Literatur über Ciliagglutinogen.

Smith u. Reach glauben dem Bakterienkörper und den Geißeln verschiedene agglutinogene Substanz, dementsprechend verschiedene Agglutinine (Somato- und Ciliagglutinogene) zusprechen zu können; sie untersuchten den beweglichen Bazillus der Hogcholera und einen beweglichen Bazillus, welchen sie serologisch identifizierten; das Serum des ersteren ist viel kräftiger als das des letzteren, verliert durch Adsorption mit letzterem (Körpersubstanz) nicht an seiner Wirksamkeit für den beweglichen.

de Rossi konnte bei seiner eingehenden Untersuchung beweisen, daß die Geißeln, welche die agglutininbildende Fähigkeit mit dem bakteriellen Protoplasma gemeinsam haben, die agglutininfixierende Fähigkeit im höchsten Grade besitzen; er fand die Agglutinine bei einer Art reichlich begeißelter Bazillen (Bac. subtilis): a) durch einfache Aufschwemmung, b) durch die nach Schütteln in NaCl-Lösung und Zentrifugieren erhaltene klare Flüssigkeit, die zahlreiche Geißeln enthält, c) durch das aus Bazillenkörpern bestehende Sediment, und d) aus der weiteren Spülflüssigkeit dieser Bazillen, von ungleicher Stärke; sie besaßen den Titer 1:1600, 1:750, 1:650 und 1:50, so daß die Seren, die von geißelhaltiger Flüssigkeit und durch Bakterienkörper gewonnen sind, zusammen etwa dieselbe Stärke wie dasjenige durch die kompletten Bazillen erhaltene besitzen.

Er bemerkte, daß die Geißeln agglutininbildende und stark agglutininbindende Fähigkeiten besizten; er erklärt aber über die Verschiedenheit von Somato- und Ciliagglutinogene (Smith u. Reach) nichts.

Aus den bisherigen Versuchen ergibt sich nicht, daß die Geißeln wirklich eine agglutinogene Wirkung innehaben, denn es kann auch in dieser geißelhaltigen Flüssigkeit außer den Geißeln noch gelöste Bakterienkörpersubstanz (die „freien Rezeptoren" von Neißer u. Shiga) zurückgehalten worden sein.

2. Agglutininbildendes Vermögen der Geißeln.

Einzelne Geißeln sind äußerst leicht und daher durch Zentrifugieren fast unmöglich anzusammeln.

Deshalb konnte Rossi sie nicht ansammeln und daher brauchte er „seine sogenannte geißelhaltige Flüssigkeit", um damit Tiere zu immunisieren.

Es ist mir aber gelungen, die Geißeln selbst durch meine Geißelagglutinationsmethode sehr leicht anzusammeln.

Die agglutinierten Geißelflocken wurden zentrifugiert und das so erhaltene Geißelsediment wurde mit physiologischer Kochsalzlösung mehrmals abgewaschen und dann in bestimmten Mengen von neuer physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und zur Konservierung 0,5proz. Karbolsäure zugesetzt. Mit der so behandelten reinen Geißelflockenaufschwemmung wurden Kaninchen intravenös injiziert.

Das Kaninchenserum agglutiniert, wie im nächsten Kapitel ausgeführt wird, die reine Bakterienaufschwemmung (komplette oder originale Bakterien) stark, die Geißelaufschwemmung ziemlich stark und die Bakterienkörperaufschwemmung hingegen bedeutend schwächer.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß die Geißeln selbst unabhängig von der Bakterienkörpersubstanz ein agglutininbildendes Vermögen besitzen.

3. Differenzierung der Agglutinine bzw. der agglutinogenen Substanzen der Geißeln und des Bakterienkörpers.

Die Kondenswasserkultur reichlich begeißelter Typhusbazillen wurde sorgfältig zentrifugiert und die so erhaltene Bakterienmasse wurde in physiologischer Kochsalzlösung (1 ccm enthält 1 Milliarde Bazillen nach Wrightscher Methode) durch schwaches Schütteln suspendiert. Die Aufschwemmung wurde in 3 Teile geteilt; daraus habe ich 4 verschiedene Materialien dargestellt, wie folgt: 1) dieselbe Aufschwemmung (komplette Bakterienkontrolle), 2) geschüttelte Aufschwemmung, 3) Geißelflockenaufschwemmung (siehe oben) und 4) Bakterienkörperaufschwemmung. In 1 ccm von jedem Material sind eine Milliarde Bazillen (1 u. 2), sowie ungefähr demgemäß sensibilisierte Geißeln (3) oder Bakterienkörper (4) enthalten. Alle wurden bei 58° C 1 Std. erwärmt und konserviert mit 0,5proz. Karbolsäure.

Tabelle V (1).

Agglutininbildendes Vermögen der kompletten Bakterien (Kontrolle) (Immunserum von Kaninchen Nr. 55).

M.	Originalaufschwemmung vom K.W. (komplette Bazillen)			Geißelaufschwemmung			Bakterienkörperaufschwemmung			
Z.	1	2	24	1	2	24	1	2	4	24
SV.	Agglutination									
40	++	++	+++	—	⧺	+++	—	⧺	+	++
80	++	++	+++	—	⧺	+++	—	⧺	+	++
160	+	++	+++	—	—	++	—	—	⧺	+
320	+	++	++	—	—	+	—	—	±	+
640	⧺	+	++	—	—	±	—	—	—	⧺
1 280	±	⧺	+	—	—	—	—	—	—	±
2 560	—	⧺	⧺	—	—	—	—	—	—	—
5 120	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—
10 240	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fl.	groß			sehr groß			klein			
G. R. E.	schnell			langsam			sehr langsam			

Tabelle V (2).
Agglutininbildendes Vermögen der nur geschüttelten Bakterien (Bakterienkörper mit abgetrennten Geißeln). (Immunserum von Kaninchen Nr. 56.)

M.	Originalaufschwemmung vom K.W. (komplette Bazillen)			Geißelaufschwemmung			Bakterienkörperaufschwemmung			
Z.	1	2	24	1	2	24	1	2	4	24
SV.	Agglutination									
40	++	+++	+++	−	+	+++	−	⧺	+	++
80	++	++	+++	−	−	++	−	⧺	+	++
160	+	++	++	−	−	++	−	−	⧺	+
320	+	++	++	−	−	⧺	−	−	−	+
640	⧺	+	++	−	−	−	−	−	−	⧺
1 280	±	+	++	−	−	−	−	−	−	±
2 560	−	⧺	+	−	−	−	−	−	−	−
5 120	−	−	±	−	−	−	−	−	−	−
10 240	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Fl.	groß			sehr groß			klein			
G. R. E.	schnell			langsam			sehr langsam			

Tabelle V (3).
Agglutinierendes Vermögen der Geißeln allein (die agglutinierten Geißelflocken). (Immunserum von Kaninchen Nr. 54.)

M.	Originalaufschwemmung vom K.W. (komplette Bazillen)			Geißelaufschwemmung			Bakterienkörperaufschwemmung			
Z.	1	2	24	1	2	24	1	2	4	24
SV.	Agglutination									
40	++	++	+++	−	±	+++	−	−	⧺	++
80	++	++	+++	−	⧺	++	−	−	±	+
160	+	++	++	−	−	+	−	−	⧺	⧺
320	⧺	+	++	−	−	+	−	−	−	−
640	⧺	+	+	−	−	±	−	−	−	−
1280	−	±	⧺	−	−	−	−	−	−	−
2560	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Fl.	groß			sehr groß			klein			
G. R. E.	schnell			langsam			sehr langsam			

Tabelle V (4).
Agglutininbildendes Vermögen der geißelfreien Bakterienkörper. (Immunserum von Kaninchen Nr. 57.)

M.	Originalaufschwemmung vom K.W. (komplette Bazillen)			Geißelaufschwemmung			Bakterienkörperaufschwemmung			
Z.	1	2	24	1	2	24	1	2	4	24
SV.	Agglutination									
40	⧺	++	++	−	−	+	±	+	++	+++
80	⧺	+	++	−	−	±	⧺	⧺	+	+++
160	±	⧺	+	−	−	−	−	±	+	++
320	−	±	⧺	−	−	−	−	⧺	+	++
640	−	−	±	−	−	−	−	−	±	+
1280	−	−	−	−	−	−	−	−	−	⧺
2560	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±
5120	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Fl.	groß			sehr groß			klein			
G. R. E.	schnell			langsam			sehr langsam			

Mit je 0,5 ccm von den 4 oben erwähnten Materialien wurden 4 Kaninchen, die fast dasselbe Gewicht hatten und ungefähr in gleich gutem Ernährungszustande waren, an demselben Tag intravenös gespritzt. Mit 6tägigem Intervalle wurden sie noch 2mal (jedesmal je 1 ccm) geimpft. Am 8. Tage nach der letzten Impfung wurden die Immunsera entnommen und deren Agglutinationskraft gegen verschiedene Aufschwemmungen untersucht.

Wie aus den 4 Tabellen (V) zu erkennen ist, agglutinieren die Seren, welche mittels 1) und 2) gewonnen sind, die originale Bakterienaufschwemmung gleich stark, die Geißelaufschwemmung mittelgradig stark und die Bakterienkörperaufschwemmung schwach; man findet kaum darin einen Unterschied zwischen den beiden Agglutinationsfähigkeiten.

Das Serum, welches mit 3) erhalten ist, agglutiniert die originale Aufschwemmung stark, die Geißelaufschwemmung auch ziemlich stark und die Bakterienkörperaufschwemmung ganz schwach.

Das Serum, das von 4) hergestellt ist, agglutiniert die originale Aufschwemmung nicht so stark, die Geißelaufschwemmung kaum und die Bakterienkörperaufschwemmung ganz besonders stark. Die beiden Sera, die mittels der Geißeln und des Bakterienkörpers gewonnen sind, agglutinieren jede homologe Aufschwemmung stark, die heterologe hingegen sehr schwach.

In wiederholten Versuchen ergab sich stets dasselbe Resultat, das zu der Annahme berechtigt, daß die Geißeln und der Bakterienkörper unabhängig voneinander je ein spezifisch stark agglutininbildendes Vermögen besitzen, wenn auch zwischen beiden Vermögen untereinander eine geringe Gemeinschaft vorhanden ist.

Ferner konnte ich durch das Absorptionsphänomen feststellen, daß die Geißeln und der Bakterienkörper selbständig spezifisch stark agglutininbindendes Vermögen besitzen, das bei beiden auch zum geringen Teile ein gemeinsames ist.

Es erklärt sich daher, daß die Zilien selbst ein spezifisch agglutininbildendes und -bindendes Vermögen gegenüber demjenigen der Bakterienkörper in sich fassen.

4. Die Beziehungen der Geißeln zur Agglutinabilität bzw. zur Antigenität.

Es ist bekannt, daß bei Typhusbazillen die Agglutinabilität mit ihrem agglutinin-fixierenden Vermögen in Uebereinstimmung steht; denn die Ausflockung selbst ist ein sekundärer Vorgang, der durch verschiedene Umstände beeinflußt werden kann.

Das spezifische Bindungsvermögen und die antigene Natur sind demnach die charakteristische Eigenschaft der agglutinablen Substanz der Typhusbazillen.

Wie ich oben berichtet habe, haben die Geißeln und der Bakterienkörper voneinander verschiedene Agglutinabilität sowie verschiedenes agglutininbildendes und -bindendes Vermögen.

Es mußten daher die Beziehungen von Geißeln und dem Bakterienkörper etwas eingehender untersucht werden.

Die komplizierten Versuche habe ich tabellarisch wiedergegeben (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Veränderungen der Agglutinabilität, des agglutininbildenden und -bindenden Vermögens durch Erhizten.

M.	Originalaufschwemmung vom Kondenswasser			Geschüttelte Aufschwemmung vom Kondenswasser			Geißelaufschwemmung			Bakterienkörperaufschwemmung		
	A	F	B	A	F	B	A	F	B	A	F	B
T. u. Z.	Resultat											
VE	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++	+++	+	+++	+++
60° C 1 Std.	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	++	++	+	+++	+++
65° C 5 M.	+++	++++	++++	++	++++	++++	++	++	++	+	+++	+++
65° C 10 M.	+	++++	++++	+	++++	++++	—	++	++	+	+++	+++
70° C 1 Std.	+	+++	++++	+	++++	+++	—	++	++	+	+++	+++
80° C 1 Std.	±	+++	+++	±	+++	+++	—	+	+	±	+++	+++
100° C 1 Std.	+	++	++	+	++	++	—	±	±	+	++	++
100° C 3 Std.	++	++	++	++	++	++	—	—	—	++	++	+

Anmerkungen:

T. u. Z. = Temperatur u. Zeit
A = Agglutinabilität
F = agglutininfixierendes Vermögen
B = agglutininbildendes Vermögen
VE = Vor dem Erhitzen
Std = Stunden, M = Minuten

Es ist ersichtlich, daß die Agglutinabilität der Bakterien nicht stets übereinstimmt mit ihrem agglutininbildenden sowie mit ihrem agglutininbindenden Vermögen; d. h. komplette und geschüttelte Bakterien haben verschiedene Agglutinabilität, wohl aber sind die Antigenitäten (agglutininbildendes und -bindendes Vermögen) von beiden fast gleich; während bei kompletten Bakterien eine starke Verminderung der Agglutinabilität durch 65° C 10 Min. langes Erhitzen zustande kommt, ist ihre Antigenität aber nicht dementsprechend beeinträchtigt. Wenngleich die Agglutinabilitätsveränderung von geschüttelten (sowie kompletten) Bakterien und von den Bakterienkörpern von 70° C bis 100° C übereinstimmend ist, so gibt es bei den Antigenitäten doch einen gewissen Unterschied.

Trotzdem man die Agglutinabilität von Geißeln durch Erhitzen auf 65° C 10 Min. zum Verschwinden bringt, wird gleichzeitig aber ihre Antigenität nicht so stark geschädigt. Bei der „Geißelagglutination" ist es also möglich, daß, obgleich die agglutinatorische Reaktion nicht zustande gekommen ist, wohl die darin enthaltene spezifische agglutinogene Substanz das Agglutinin homologen Immunserums aufnimmt.

Die Antigenität (agglutininbildendes und -bindendes Vermögen) der Geißeln sowie des Bakterienkörpers zeigt gegen Erhitzen eine Neigung allmählicher Verminderung. Diese Verminderung gegen Erhitzen ist bei den Geißeln größer als die des Bakterienkörpers; während die Antigenität bei ersteren durch 100° C 3 Std. Erhitzen fast vollständig verloren geht, leidet die des letzteren bei dieser Temperatur nur eine geringfügige Verminderung.

Durch diese Versuche stellte ich fest, daß die Agglutinabilität mit ihrer Antigenität bei kompletten Bakterien, bei den Geißeln, sowie auch beim Bakterienkörper nicht immer in Uebereinstimmung steht.

5. Agglutinogene Substanz der Typhusbazillen.

Smith u. Reach vermuteten, wie schon erwähnt, daß die Typhusbazillen zwei verschiedene agglutinogene (Somato- und Ziliagglutinogene) haben.

Auch Rossi bemerkte, daß die Geißeln agglutinin-bildendes und bindendes Vermögen besitzen und die Eigenschaften der Geißeln derjenigen des bakteriellen Protoplasmas gemeinsam sind.

Dagegen berichten die meisten Forscher, vor allem Porges, daß die agglutinogene Substanz einheitlich und von einfachem Bau ist. Eisenberg u. Volk etc. behaupten, daß das Agglutinogen einheitlich ist und einen komplexen Bau (funktioneller- und bindender Anteil) besitzt.

Vor kurzem teilten Weil, Watanabe usw. mit, daß bei Typhusbazillen zwei verschiedene Rezeptoren (thermolabiler und stabiler Rezeptor) nachzuweisen sind.

Aus den angeführten Versuchen ergibt sich, daß den Geißeln und dem Bakterienkörper je eine verschiedene agglutinogene Substanz zuzuschreiben ist. Wenngleich die Meinung von Smith u. Reach nicht auf beweiskräftigem Versuch beruht, stimmt sie jedoch mit der von mir bewiesenen Tatsache fast überein.

Ob die thermolabilen Rezeptoren Weils usw. zu den Geißeln irgendeine Beziehung haben, kann ich hier nicht feststellen; obwohl sie die Beziehung zwischen den Geißeln und den thermolabilen Rezeptoren gar nicht erklärt haben, ist in der Mitteilung von Watanabe bei begeißelten Bakterien die Anwesenheit dieser Rezeptoren mit dem Vorhandensein der von mir festgestellten agglutinogenen Substanzen der Geißeln fast parallel. So scheinen mir die agglutinogene Substanz der Geißeln und des thermolabilen Rezeptors von Weil usw. einerseits miteinander etwas ähnlich, andererseits jedoch wesentlich verschieden voneinander, da die Autoren sagten, daß dieser Rezeptor auch bei geißellosen Bakterien in gewissem Grade bemerkbar ist.

Ich bemerkte auch bei geißelfreien Bakterien eine geringfügige Hypagglutinabilität durch Erwärmen auf 65° C; ich meine aber, daß die Ursache der Hypagglutinabilität nicht die Zerstörung dieses Rezeptors ist, sondern daß die wahre Ursache derselben höchstwahrscheinlich in irgendeinem chemischen Prozeß des Bakterienproteins zu suchen ist.

C. Die Beziehungen der Geißeln zur Agglutination bei Typhusbazillen.

Ich will hier zusammenfassend über die Bedeutung der Geißeln zur Agglutination bei Typhusbazillen sprechen.

Wie schon erwähnt, haben die kompletten und die geschüttelten Bakterien fast die gleiche Antigenität, während zwischen der Agglutinabilität beider, sowie den Geschwindigkeiten des Reaktionseintritts und den Ausflockungszuständen der kompletten und geschüttelten Bakterien ein gewisser Unterschied zu finden ist.

Die Ursache dieses Unterschieds hängt hauptsächlich von der Abtrennung der Geißeln von den Bakterienkörpern ab. Daher spielt die Anwesenheit der Geißeln bei der schnell auftretenden, größere Flocken bildenden Agglutinationsreaktion der Typhusbazillen eine wesentliche

Rolle; auch muß es dabei absolute Bedingung sein, daß die Geißeln noch völlig mit dem Bakterienkörper zusammenhängen.

Während die Flocken bei der Agglutination mit der Bakterienkörperaufschwemmung kleiner sind, wohl aber die bei der Geißelagglutination sehr groß wie ein Schwämmchen, läßt es sich vermuten, daß, wenn die Geißeln und der Bakterienkörper noch fest verbunden sind (komplette Bakterien), die Ausflockung dabei mittelgradig grobflockig sein wird, und zwar infolge des Zusammenwirkens beider Komponenten.

Ferner wurde durch die Geißelagglutination experimentell nachgewiesen, daß die Geißeln selbst eigentliche Agglutinabilität haben. Weitere Versuche über die Agglutinabilität derselben führten zu der Annahme, daß die Ursache der Hypagglutinabilität von Typhusbazillen nach Erhitzen bei 65° C durch die Zerstörung der Geißeln verursacht wird.

Weiterhin konnte ich feststellen, daß das spezifische agglutininbildende und -bindende Vermögen der Geißeln in keiner Beziehung zu der Agglutinabilität derselben steht.

Bei reichlich gegeißelten Bakterien, z. B. bei Typhusbazillen oder bei Proteusbazillen, schwankt ihre Agglutinabilität deutlich durch verschiedene Einflüsse (Schütteln, Erwärmen usw.) mit fast keinerlei Veränderung von ihrer Antigenität.

Aus den erwähnten Gründen möchte ich die mannigfaltige Bedeutung der Geißeln für die Agglutination von begeißelten Bakterien, wie folgt, zusammenfassen:

1. Bei der Agglutinabilität reichlich begeißelter Bakterien spielen die Geißeln eine große Rolle. — 2. Die Hypagglutinabilität der auf 65° C erhitzten begeißelten Bakterien ist verursacht durch das Verschwinden der Geißeln bei Erhitzen auf diese Temperatur. — 3. Die Geißeln haben ihre eigene Agglutinabilität. — 4. Die Geißeln besitzen ihre eigene, selbständige, in gewissem Grade von den Bakterienkörpern unabhängige Antigenität. — 5. Das schnelle Eintreten der Agglutination und der grobe Ausflockungszustand müssen mit dem Vorhandensein der Geißeln innige Beziehungen haben.

Die Agglutinabilitätsschwankungen der Typhusbazillen, welche, wie schon erwähnt, durch Nährbodenart, Säure, Alkali, Kultivierungstemperatur und andere Einflüsse bedingt werden, glaube ich, hauptsächlich durch die Veränderung der Geißeln, die durch solche Einflüsse sehr leicht geschädigt werden, erklären zu können. Es ist wohl klar, daß bei reichlich begeißelten Bakterien die Bedeutung der Geißeln für den Mechanismus der Agglutination sehr groß und verhältnismäßig ebenso klein bei wenig begeißelten ist.

Ich möchte betonen, daß der Agglutinationsprozeß bei begeißelten Bakterien mit ernstlicher Berücksichtigung der Geißeln beobachtet werden muß.

Wenn man die theoretische Bedeutung der Geißeln anerkennen will, so muß man die Geißeln von reichlich begeißelten Bakterien, welche im Kondenswasser des Agarnährbodens sorgfältig kultiviert wurden, studieren.

Zusammenfassung und Schlußsätze.

1. Die Agglutinabilität von Typhusbazillen, welche im Kondenswasser sorgfältig kultiviert wurden, ist stärker als die der von der Oberfläche des Schrägagars erhaltenen Bakterien. Die Reaktion tritt bei ersteren mit größeren Flocken und schneller ein als bei letzteren. Dieser Unterschied stimmt mit der Verschiedenheit des Wachstums der Geißeln der beiden Kulturen überein. — 2. Durch einfaches Schütteln der aus der Kondenswasserkultur hergestellten Bakterienaufschwemmung bis zur vollständigen Abtrennung der Geißeln wird die Agglutinabilität der Bazillen ziemlich vermindert; der Reaktionseintritt wird bedeutend verzögert und die agglutinierten Flocken sind etwas kleiner. — 3. Der Unterschied der Agglutinabilität der Bakterien von Kondenswasser- und von Schrägagarkultur wird stark vermindert durch Schütteln von beiden bis zur Geißelabtrennung. — 4. Die Ursache der Agglutinabilitätsveränderung, die durch Schütteln erzeugt wurde, ist bedingt durch das Freiwerden der Geißeln von den Bakterienkörpern; volle Agglutinabilität sowie schneller Reaktionseintritt und grobe Flocken der kompletten Bakterien sind nur durch das Zusammenarbeiten von Geißeln und Bakterienkörpern zu erhalten. — 5. Durch Schütteln und Zentrifugieren der Typhusbazillenaufschwemmung, die von der Kondenswasserkultur gewonnen ist, werden die „Geißel"- und die „Bakterienkörperaufschwemmung" hergestellt. Setzt man zur Geißelaufschwemmung eine gewisse Menge von Typhusimmunserum zu, so tritt hier eine eigenartige „Geißelagglutination" hervor; diese Tatsache beweist, daß die Geißeln selbst, unabhängig von Bakterienkörpern, ihre eigene Agglutinabilität besitzen.

Die Bakterienkörperaufschwemmung wird schwächer agglutiniert mit kleineren Flocken sowie mit verzögertem Reaktionseintritt als die geschüttelte Bakterienaufschwemmung. — 6. Mit den agglutinierten Geißelflocken sind die Eigenschaften der Geißeln, welche ich schon mitgeteilt habe, makroskopisch nachweisbar; vor allem ist wichtig, daß diese Geißelflocken durch 10 Min. langes Erwärmen auf 65° C zum Verschwinden gebracht werden.

Demnach hängt die Agglutinabilität der Geißeln bei „Geißelagglutination" nur von der Anwesenheit der Geißelkörper ab; d. h. wenn die Geißeln durch irgendeinen Eingriff zerstört werden, geht ihre Agglutinabilität gleichzeitig verloren. — 7. Die Geißeln und der Bakterienkörper haben verschieden starkes spezifisches, agglutininbildendes und -bindendes Vermögen inne, obgleich diese Eigenschaften der Geißeln und der Bakterienkörper untereinander in nahem Zusammenhang stehen.

Die Agglutinabilität stimmt nicht mit dem agglutininbildenden und -bindenden Vermögen der Geißeln, sowie der Bakterienkörper überein. Die letztgenannten Eigenschaften der Geißeln sind etwas

empfindlicher gegen Hitze als die des Bakterienkörpers. — 8. Nach den Resultaten der geschilderten Versuche beruht die Ursache der Hyp-agglutinabilität auf 65° C erwärmter Typhusbazillen hauptsächlich auf der Zerstörung der Geißeln; die Anschauung von Porges wird also wahrscheinlich nur für die Agglutinabilitätsveränderung durch Erwärmen der Bakterienkörper allein gültig sein. — 9. Die Bedeutung der Geißeln für die Bakterienagglutination ist bei reichlich begeißelten Bakterien sehr groß, verhältnismäßig klein bei wenig begeißelten.

Da die Geißeln verschiedene besondere Eigenschaften haben, so sollte man diese bei den Immunreaktionen der reichlich begeißelten Bakterien mehr berücksichtigen.

Zum Schluß sei es mir gestattet, Herrn Prof. Dr. M. Takenouchi für das wohlwollende, dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse und die freundliche Leitung derselben meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

de Rossi, Gino, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 36. 1904. — Ders., Ebenda. Bd. 37. 1904. — Ders., Ebenda. Bd. 40. 1906. — Neißer u. Shiga, Dtsch. med. Woch. 1903. Nr. 4. — Kolle, W., u. v. Wassermann, A., Handb. d. path. Mikroorg. Bd. 1. 1913. — Dies., Ebenda. Bd. 2. (1.) 1913. — Porges, O., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 41. 1906. — Ders., Handb. d. Immunitätsforschung. Bd. 2. 1909. S. 1136. — Ders., Zeitschrift für experimentelle Pathologie. Bd. 1. 1905. — Joos, A., Ztschr. f. Hyg. Bd. 36. 1902. — Ders., Ebenda. Bd. 40. 1902. — Eisenberg u. Volk, Ztschr. f. Hyg. Bd. 46. 1902. — Asakawa, Ebenda. Bd. 45. 1902. — Hinterberger, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 36. 1905. — Smith and Reach, Stud. from the Rockefeller Instit. Vol. 1. 1904. — Widal et Sicard, Compt. Rend. Soc. de Biol. 1896. — Dies., Ibid. 1897. — Weil und Felix, Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 26. — Dies., Ebenda. Bd. 37. — Dies., Ebenda. Bd. 37. — Moriie, Ztschr. d. Jap. Mikrobiol. Gesellsch. Bd. 15. Nr. 7. — Seki, Ebenda. Bd. 15. Nr. 8. — Tsujitani, Ebenda. Bd. 15. Nr. 8. — Watanabe, Ztschr. d. Bakt. Nr. 313. — Yokota, Ztschr. d. Hokuetsu Med. Gesellsch. Nr. 231. — Ders., Ztschr. d. Japan. Hyg. Infekt.-Gesellsch. Bd. 18. Nr. 4. — Ders., Compt. Rend. Soc. de Biol. T. 90. 1924. No. 17.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Fig. 1. Makroskopisches Bild meiner „Geißelagglutination.

Fig. 2. Mikroskopisches Bild derselben nach meinem Geißelfärbungsverfahren. (Zeiß, Apochromat. 4 mm Komp.-Okular 4.)

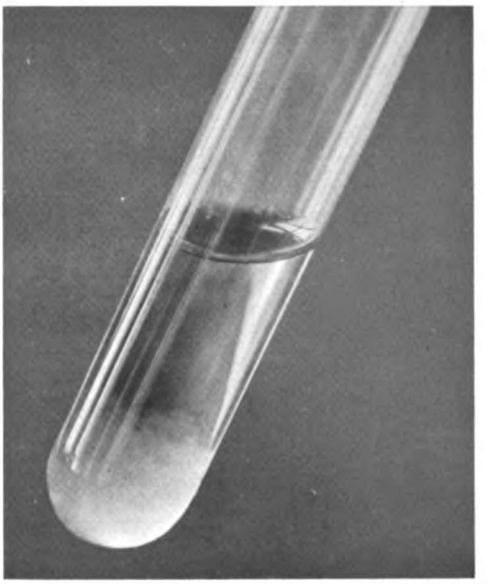


Fig. 1.

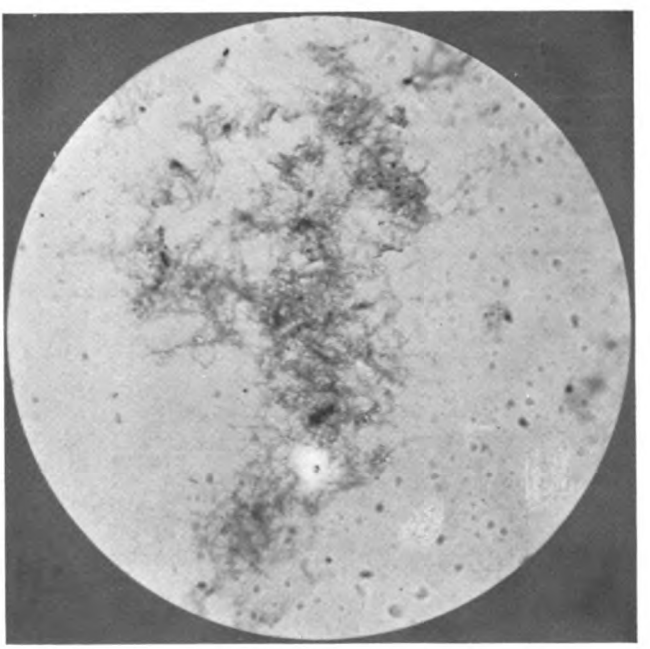


Fig. 2.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

THE LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS

Nachdruck verboten.

Vitaminähnliche Substanzen in ihrer Wirkung auf das Wachstum der Influenzabazillen (Baz. Pfeiffer).

3. Mitteilung: Die Rolle des sogenannten X-Faktors für die Biologie der Influenzabazillen.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. **Werner Kollath**, Assistenten am Institut.

Mit 1 Abbildung im Text.

Nachdem R. Pfeiffer im Blut das Substrat gefunden hatte, das für das Wachstum der I.B. notwendig war, hat er auch versucht, diejenige Substanz des Blutes zu bestimmen, die das Wachstum herbeiführte. Er konnte zeigen, daß „die von Serum und Fibrin befreiten roten Blutkörperchen, auf die Agaroberfläche gestrichen, ein äußerst üppiges Wachstum gaben. Es war damit bewiesen, daß der gesuchte Stoff in den roten Blutkörperchen enthalten ist." Bei weiteren chemischen Untersuchungen gelangte er zu der Erkenntnis, daß „das Hämoglobin der gesuchte Bestandteil sei". Es galt nun zu prüfen, ob es bei der Züchtung der I.B. in seiner Eigenschaft als Sauerstoffüberträger wirksam ist. Dagegen entschied folgendes Experiment: Die I.B. wuchsen nämlich auch in einer fast reinen Kohlenoxydatmosphäre, so daß „einwandfrei dargetan war, daß die Fähigkeit des Hämoglobins, lockere, leicht dissoziierende Sauerstoffverbindungen einzugehen, für die I.B. gleichgültig ist". „Auch auf 70° erhitztes und gekochtes Blut ergab Wachstum" .... „Der Gedanke lag unter diesen Umständen sehr nahe, daß der Eisengehalt des Hglb. das wirksame Prinzip sein möchte. Wir kennen Mikroorganismen, die, wie Chrenothrix polyspora, ausschließlich in eisenhaltigen Nährlösungen gedeihen. Es war recht gut möglich, daß auch I.B. sich ähnlich verhalten. Meine (Pfeiffers) bisherigen Versuche mit künstlich hergestelltem Eisenalbuminat haben allerdings kein Resultat ergeben, aber ich gebe die Hoffnung nicht auf, durch systematische Experimente mit Eisensalzen einen Nährboden zu finden, welcher gestattet, von dem immerhin umständlichen Blutagar abzusehen."

Die Durchsicht der Literatur zeigt nun, daß wir seit dieser klassischen Arbeit von Pfeiffer nur wenig über seine Resultate herausgekommen sind. Zwar ist es gelungen, die wachstumsfördernden Eigenschaften des Blutes insofern zu definieren, daß wir erstens eine vitaminähnliche Substanz, den sog. V-Faktor (Thjötta und Avery) im Blute als wirksam kennen, daß wir aber zweitens auch des weiteren eine bisher nicht genauer zu definierende Substanz im roten Blutfarbstoff annehmen müssen, den sog. X-Faktor. Wir wissen ferner, daß beide Faktoren nicht nur im Blut, sondern auch gemeinsam in Früchten und anderen Pflanzenprodukten vorkommen, und daß die Wirksamkeit beider Substanzenn noch in hochgradigen Verdünnungen eintritt. So wirkt der X-Faktor in festen Nährböden noch in einer Verdünnung von etwa 1:200000, in flüssigen in einer Verdünnung von 1:2000000

(Fildes, Olsen), der V-Faktor in Verdünnungen 1:2000—10000 (eigene Versuche) in festen, in 1:30000 (Knorr) in flüssigen Nährböden. Eine Entscheidung über das Wesen des V-Faktors ist, wie bei allen anderen Vitaminen, noch nicht möglich; und auch über den X-Faktor ist eine Einigung noch nicht erzielt. R. Pfeiffer faßt in Weichardts Ergebnissen (Bd. 5. 1922. S. 11) den damaligen Stand der Forschung dahin zusammen: „Es scheint die Entscheidung dahin zu neigen, daß, wie ich schon anfangs annahm, die eisenhaltige Komponente des Hämoglobinmoleküls hierbei wesentlich ist. Während die I.B. auf Methämoglobinnährböden fast ebenso gut gedeihen wie auf O—Hglb. wachsen sie auf Hämin und Hämatin nur in Symbiose mit gewissen Bakterienarten, deren wachstumsfördernde Eigenschaft für die I.B. schon seit langem bekannt ist. Auf Hämatoporphyrin, welches ein eisenfreies Derivat des Hglb. darstellt, blieb bemerkenswerterweise das Wachstum der I.B. völlig aus, auch in Gegenwart begünstigender Bakterienarten. Ob die Hypothese Olsens berechtigt ist, wonach die für das Wachstum der I.B. wesentliche Eigenschaft des Hglbs und seiner Derivate auf deren katalytischen Funktionen beruht, ist allerdings zweifelhaft. Die Tatsache, daß Blutfarbstoffe niederer Tiere, welche kein Eisen enthalten, aber trotzdem eine ausgesprochene Oxydasereaktion geben, für das Wachstum der I.B. unwirksam sind, spricht entschieden für die wichtige Bedeutung des Eisenkerns im Hglb.-Molekül. Es scheint, daß unter bestimmten Verhältnissen ein, wenn auch kümmerliches, Wachstum der I.B. auch ohne Hglb. eintreten kann, aber nur bei Gegenwart gewisser Bakterienarten, von denen sich die Shiga- und Di-Bazillen als besonders wirksam erwiesen. Sie ermöglichten nicht allein im lebenden Zustande in Mischkultur, sondern auch abgetötet dem Nährboden beigemengt, die Entwicklung von I.B., die aber dann sehr atypisch aussahen, höchst kümmerlich gediehen und nur wenige Generationen überimpfbar blieben. Ein naheliegender Einwand konnte gegen diese Versuche erhoben werden. Die benutzten Nährböden waren mit Fleischwasser hergestellt, welches ja stets mehr oder weniger Hglb.-Farbstoff gelöst enthält. Es konnten daher in dem fertigen Agar kleine, aus dem Fleischwasser stammende Mengen von Hglb.-Derivaten enthalten sein, welche für sich allein zu einer Entwicklung der I.B. ungenügend wären, bei Gegenwart der oben genannten Bakterienarten dagegen ein, wenn auch geringes, Wachstum ermöglichten. Ich habe durch Kalkbrenner Versuche anstellen lassen, diesen Einwand zu entkräften, und es ist diesem Autor tatsächlich gelungen, auf Agar, der unter Verzicht auf Fleischwasser mit reinem dest. Wasser hergestellt war, durch Zusatz von Di-Bazillen I.B.-Wachstum zu erzielen: allerdings ist auch diesem Befund gegenüber der weitere Einwand möglich, daß vielleicht das dem Nährboden zugesetzte Pepton Spuren von Hglb.-Derivaten enthalten habe. Die Asche der Di-Bazillen selbst erwies sich als völlig eisenfrei.“ Kalkbrenner gibt ferner an, daß die I.B. atypische Kolonie- und Fadenbildung zeigten. Wachstum glückte ihm auch ausnahmsweise auf Wasseragar + Hefe.

Nach dieser Anführung aus R. Pfeiffers eigenen Arbeiten erübrigt sich wohl eine ausführliche Literaturübersicht über diese Frage, zumal ich schon an anderer Stelle (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93) auf die Angaben anderer Autoren eingehen konnte. Besonders erwähnen möchte ich aber die zusammenfassende Uebersicht von Knorr, der bei Besprechung des X-Faktors sagt: „Die Natur des X-Körpers

ist noch dunkler als die des V-Faktors. Mit vollem Rechte weisen deshalb Levinthal und Fernbach darauf hin, daß der Natur und Wirkungsweise des Körpers X weitere Studien gelten müssen."

R. Pfeiffers Vermutung, daß der Eisenbestandteil das Wesentliche des Blutfarbstoffes für das I.B.-Wachstum sei, wird von der Mehrzahl der Autoren geteilt. Eine Ausnahme machen lediglich Tokugana, der den Hauptwert in dem Globinbestandteil sieht, und Jakobi und Frankenthal, die mit Histidin und Leucin, Abbauprodukten des Hämoglobins, Wachstum erzielt haben wollten. Gehlen (Diss. Erlangen) konnte bei der Nachprüfung der Arbeit der beiden letzten Autoren nachweisen, daß die von der Fabrik bezogenen Stoffe nicht chemisch rein waren, sondern die Benzidinprobe gaben, also noch Bluteisen enthielten und auch die Tokuganaschen Arbeiten haben der Nachprüfung nicht standgehalten (Levinthal-Fernbach). Man darf deshalb behaupten, daß die Notwendigkeit des Bluteisens jetzt wohl allgemein zugegeben wird, daß aber über die spezielle Wirkungsweise noch Ungewißheit herrscht. Meine im folgenden angeführten Versuche habe den Zweck, hier weitere Klärung zu schaffen.

Trotzdem R. Pfeiffer bereits in seiner ersten Arbeit, wie oben erwähnt, es als sehr unwahrscheinlich hinstellen konnte, daß die Sauerstoffübertragungsfähigkeit des Blutes nicht der Grund für seine wachstumsfördernde Wirkung sei, wird in den meisten Arbeiten doch auf diese Fähigkeit des Blutes hingewiesen und sie für das Wachstum verantwortlich gemacht. Olsen vermutet ein weitgehendes Hand-in-Handgehen mit der Benzidinreaktion, und auf diesen etwaigen Zusammenhang kommen die meisten Autoren, wie Thjötta und Avery, Fildes, Tinti immer wieder zurück; Knorr und Gehlen haben diese Frage eingehend studiert und sind zu dem Resultat gekommen, daß die Benzidinreaktion nicht identisch ist mit der Wachstumsförderung; die schon durch Pfeiffer gefundene Unabhängigkeit der wachstumsfördernden Wirkung des erhitzten Blutes, bei dem die Benzidinreaktion verschwindet, spricht wohl unbedingt gegen diese Annahme. Auch ist die Feinheit der Benzidinreaktion abhängig vom Lösungsmittel, so daß Blutfarbstoff im Nährboden vorhanden sein kann, ohne chemisch durch die Benzidinreaktion nachweisbar zu sein. Dagegen ist das Wachstum des I.B. ein weit feineres biologisches Reagens auf Blut (Knorr, Gehlen, Kollath). Für diesen Satz gilt aber eine Einschränkung, auf die ich gleich zu sprechen komme.

Die Forschung der I.B.-Züchtung erfuhr nämlich eine ungeahnte Komplikation durch die Befunde von Neisser und Cantani einerseits, von Graßberger andererseits: diesen beiden ersten Autoren gelang es, I.B.-Kolonien auf blutfreiem Agar in Abhängigkeit von sog. Ammenkolonien zu züchten, während der letztere Autor eine Wachstumsverstärkung der I.B. in der Umgebung bestimmter anderer Keime fand. Durch diese Befunde wurde die ausschließliche Bedeutung des Blutes in Frage gestellt. Im Anschluß an diese Versuche konnte Cantani nachweisen, daß auch andere Körperflüssigkeiten Wachstum zu geben schienen, doch hat sich allmählich herausgestellt, daß die von Cantani verwendeten Flüssigkeiten (z. B. Sperma, Aszites) Spuren von Blut enthalten haben müssen, und daß der fördernde Einfluß der Galle auf dem größeren oder geringeren Eisengehalt beruhte. In Nachprüfungen dieser Arbeiten von Neisser und namentlich von Cantani konnten die geschilderten Befunde nicht

bestätigt werden (Ghon und v. Preyss, Putnam und Gay); nur Ghon und v. Preyss gelang es, mit den ihnen von Cantani zugesandten Stämmen, in der Tat gelegentlich die Erscheinung hervorzurufen und gleichzeitig zu finden, daß ein Aufstrich von Cyaneisen das Ammenwachstum verstärkte. Von denselben Forschern wurden auch Versuche gemacht, durch Zusatz von abgetöteten Bakterien gewöhnlichen Agar für I.B. geeignet zu machen, aber mit wechselndem Erfolg. Luerssen gelang es, Wachstum zu erreichen, wenn er abgetötete Prodigiosuskulturen dem Agar beimengte, nicht aber, wenn er sie auf die Oberfläche des Agars aufstrich. Eine Erklärung dafür konnte er nicht geben. Graßbergers Versuche mit Mischkulturen auf Nährböden mit Eisensalzen schlugen fehl, gelangen aber bei alkalischem Hämatogen- und Hämatinzusatz.

Obwohl anläßlich dieser vielen Mißerfolge mit Eisensalzen ein Resultat schwerlich zu erwarten war, habe ich bei meinen Versuchen über das Ammenwachstum auch eine Versuchsreihe mit eisenhaltigem Agar angesetzt (Ferr. oxydat. ammoniatum 1:20000) und dabei gefunden, daß dann auf dem sonst eisenfreien Agar die Neissersche Form des Ammenwachstums in den Kolonien eines bestimmten Luftkokkus auftrat, daß also dieses Phänomen von dem Eisengehalt des Nährbodens abhängig war (Centralbl. f. Bakt., z. Zt. im Druck). Diesen Befund habe ich in späteren Versuchen weiter verfolgt und es ist gelungen, dadurch für die Wirkungsweise des sog. X-Faktors genauere Angaben zu machen, als sie bisher bekannt sind.

Um einen Ueberblick darüber zu bekommen, ob bei der gewöhnlichen Bereitungsweise des Agars Eisenverbindungen in die Nährböden gelangen können, untersuchte ich zunächst eine größere Zahl im Gebrauch befindlicher Glaswaren. Es ließ sich feststellen, daß weitaus die größte Zahl der untersuchten Reagenzgläser eine mehr oder weniger starke Eisenreaktion gaben. Die Gläser wurden zur Untersuchung mit eisenfreiem destillierten Wasser gefüllt, stehen gelassen und dann das Wasser untersucht. Zur Reaktion verwendete ich die Prüfung mit Rhodanammon nach vorheriger Ansäuerung mit einigen Tropfen 5proz. Salzsäure. Nach Durchschütteln 5 Min. stehen lassen und den Farbstoff mit Aether ausschütteln! Auf diese Weise lassen sich auch sonst kaum bemerkbare Farbreaktionen bei dieser Reaktion deutlich sichtbar machen. Die Reaktion ist feiner als die Berlinerblaureaktion und negative Resultate sind deshalb bei letzterer nicht beweisend gegen das Vorhandensein geringster Spuren. Darauf dürften manche Widersprüche zurückzuführen sein.

Darauf prüfte ich eine größere Anzahl von Agararten, die verascht wurden. Die Asche wurde dann mit destilliertem Wasser aufgenommen und dieses untersucht, wie oben angegeben. Es ließ sich feststellen, daß fast jeder Agar in geringem Maße eisenhaltig war, und Versuche auf diesen Agarsorten ergaben regelmäßig ein Ammenwachstum des I.B. in Abhängigkeit von dem früher verwendeten Luftkokkus. Eisenfreier Agar ergab dies dagegen nie. Das Hineingelangen von Eisenverbindungen kann bei dem Herstellungsprozeß in verschiedener Weise erfolgen: einmal als Restbestandteil des Blutgehaltes aus dem Fleisch, dann aber auch bei der Reinigung der Röhrchen mit roher Salzsäure, die ja meist eisenhaltig ist. Spuren können dabei immer zurückbleiben und diese genügen, um das Phänomen hervorzurufen. Es klären sich hiermit die Versuche von Cantani und

Neisser auf, und auch der verschiedene Ausfall der Nachprüfungen ist damit geklärt: Das Auftreten des Phänomens ist nicht nur abhängig von dem jeweils verwendeten Bakterienstamm, sondern auch von dem zufällig im Agar vorhandenen Eisengehalt. Hier möchte ich auf Luerssens entsprechenden Befund hinweisen; Luerssen fand auch in gewöhnlichem Agar die Berlinerblaureaktion positiv.

Nach diesen Vorversuchen suchte ich die spezielle Wirkungsweise des Eisens zu bestimmen:

Da Eisen allein, ohne Bakterienzusatz für das Wachstum des I.B. nicht ausreicht, bestand die Wahrscheinlichkeit, daß die Bakterien teilweise imstande sind, das Eisen in derartige Verbindungen zu überführen, daß es für das Wachstum der I.B. geeignet wird. Wenn dies stimmte, dann war anzunehmen, daß sich innerhalb der Bakterien Eisen nachweisen ließ. Versuche, durch Eisenreaktion bei lebenden Bakterien den Eisengehalt nachzuweisen, mißlangen: ich stellte daraufhin die Versuche so an, daß ich gewaschene Massenkulturen von Bakterien im Platintigel veraschte und die Asche mit der oben angegebenen Versuchstechnik in ungebrauchten, vorher geprüften Röhrchen untersuchte. Die Bakterien wurden teils auf sicher eisenfreiem Agar, teils auf Levinthal-Agar gezüchtet. Es ergab sich, daß der von mir verwendete Luftkokkus in ausgesprochenem Maße die Fähigkeit hatte, dreiwertiges Eisen aufzunehmen. Bei weiteren Untersuchungen bei anderen Arten ergab: Bac. typhi, Para A, Flexner, Shiga[1]), Y gaben nie Eisenreaktion, Para B dagegen, ebenso wie Xerose und Staphylokokken ergaben eine deutliche Eisenreaktion. Die beiden letzteren sind seit Neisser als Ammen bekannt. Ihre Eigenschaft, Eisenverbindungen aus dem Blut- oder anderem eisenhaltigen Nährboden in ihre Körpersubstanz aufzunehmen, befähigt sie also zu dieser Rolle. Als weitere Vorbedingung gehört zu der Ammenfähigkeit die Produktion geringer V-Mengen, wie ich an anderer Stelle ausgeführt habe (s. auch Gehlen, Inaug.-Diss). Der Beweisring für den Zusammenhang des Eisenstoffwechsels mit dem Neisserschen Ammenwachstum ist somit wohl als geschlossen anzusehen.

Als weitere Fragen waren zu beantworten, erstens: Auf welche Weise kommt das Eisen innerhalb der Ammenkeime den I.B. zugute? und zweitens: Welche Rolle spielt das Eisen in der Biologie des I.B.?

Die Beantwortung der ersten Frage gelang durch Untersuchung von Klatschpräparaten von Ammenkulturen des Luftkokkus; auf diesen Präparaten fanden sich nämlich auch Ammenkolonien, die nur mit der Immersion sichtbar waren, also die Verhältnisse in kleinstem Umfange zeigten. Dabei ließ sich regelmäßig feststellen, daß das Wachstum der I.B. fast ausschließlich auf die Randzone in unmittelbarer Umgebung der wenigen zentral gelagerten Kokken beschränkt war (s. Abbildung), oder gelegentlich in älteren Kulturen auch in Form umschriebener kleiner Kolonien Innerhalb größerer Kokkenhaufen stattfand. Eine Durchmischung schien nie vorzukommen. Aus diesen Lagerungsverhältnissen wie in der Abbildung, ist nun wohl zu schließen, daß nicht die lebenden Kokken für die I.B. notwendig sind, sondern Stoffwechsel-

1) Der Nachweis von Eisen im Shiga-Baz. (Kalkbrenner) widerspricht meinem Befund. Vielleicht handelt es sich um eine Eigentümlichkeit einzelner Stämme.

produkte, die ihrer Art nach nur von abgestorbenen Kokken stammen dürften. Damit steht in Einklang, daß bei meinen Versuchen das Wachstum der I.B. und der Kokken nicht zeitlich parallel ging, sondern daß die I.B. erst am 2.—3. Tage deutlich in größeren Mengen auftraten; in dieser Zeit waren dann schon, wie sich aus der zunehmenden Gramunsicherheit bei den Kokken ergab, zahlreiche Exemplare der Kokken abgestorben und ihre Körperbestandteile konnten diffundieren. Es handelt sich also in dem Verhältnis der I.B. zu den Kokken danach nicht um eine Symbiose, sondern um ein Schmarotzerdasein der IB.[1]).

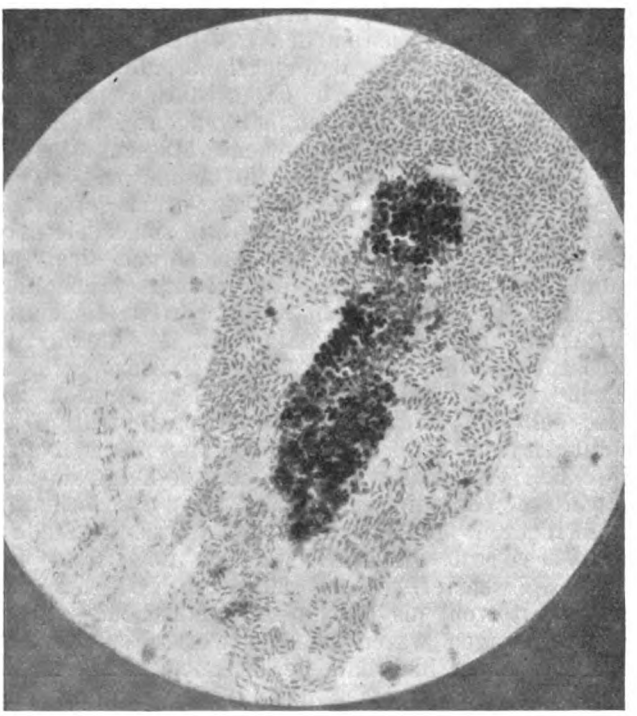


Fig. 1.

Die oben angeführte zweite Frage, welche Rolle das Eisen in der Biologie des I.B. spielt, ließ sich auch durch Untersuchen der Asche von I.B.-Kulturen zeigen:

I.B. wurden auf Levinthal-Platten 3 Tage bebrütet, dann mit

1) Es ist auffällig, daß zum Wachstum des I.B. das frische O—Hglb. nicht so günstig ist, wie das (durch Aufenthalt im Brutschrank oder durch Kochen) reduzierte Hglb., bezw. Methglb. Wenn wir auch wissen, daß das Wachstum auf unseren künstlichen Nährböden nicht ohne weiteres in Parallele zu dem Verhalten der Bakterien im Körper zu setzen ist, so könnte man doch vielleicht daran denken, daß ähnliche den Blutfarbstoff reduzierende Vorgänge gelegentlich für den Infektionsmechanismus der I.B. in Frage kommen können, und daß auch die Rolle der (Ammen-) Begleitbakterien in einer Beziehung zu solchen Reduktionsvorgängen besteht.

2 ccm Aqua dest. abgewaschen (mittels Glasspatels) und die gewonnene Emulsion in verschiedener Weise untersucht:

1) Veraschen der Emulsion, Aufnehmen in Wasser: Eisen ++. 2) Eisenreaktion der frischen Emulsion: schwach +. 3) Eisenreaktion der gekochten Emulsion: +. 4) Waschen der I.B., bis Waschwasser keine Eisenreaktion mehr gab, dann Veraschen der gewaschenen I.B.: Eisen ++. 5) Kontrolle I. Unbeimpfte Levinthal-Platte, in gleicher Weise abgewaschen (1 Min.), Eisenreaktion des Waschwassers: —. 6) Kontrolle II. Unbeimpfte Levinthal-Platte, $^1/_4$ Std. gewaschen: Eisenreaktion +. (Die mit ++ bezeichneten Reaktionen waren schon ohne Ausschütteln mit Aether deutlich rötlich gefärbt, die anderen mußten ausgeschüttelt werden).

Es läßt sich also durch diese Versuche zeigen, daß der I. B. das Eisen zu seinem Körperaufbau verwendet, denn anders ist nicht zu erklären, daß die sorgfältig gewaschenen I.B., deren Waschwasser keine Eisenreaktion mehr gab, nach dem Veraschen eine intensive Eisenreaktion geben. Und damit ist bewiesen, daß R. Pfeiffers frühere Vermutung zu Recht bestand: daß Aehnlichkeiten zwischen der Biologie der I.B. und der Eisenbakterien bestehen. Mit diesem Nachweis fällt auch die immer wieder in der Literatur auftauchende Vermutung hin, daß die sauerstoffübertragenden Fähigkeiten des Blutes die für das Wachstum des I.B. wesentliche Eigenschaft sei, da das Eisen als solches zum Körperaufbau verwendet wird.

Dieser hier beschriebene Eisenstoffwechsel ist für die I.B. so lebensnotwendig und charakteristisch, daß die Bezeichnung „siderophil" statt „hämoglobinophil" am Platze erscheint. Zwar können auch andere Bakterien, wie ich oben erwähnt habe, und wie Luerssen für den Prodigiosus gezeigt hat, Eisen in ihre Leibessubstanz aufnehmen, doch ist dies dann für sie nicht lebensnotwendig. Gleichzeitig ist mit diesen Versuchen auch der sog. X.-Faktor definiert: er ist eine am besten aus Blut, aber auch durch Bakterientätigkeit aus anorganischem Eisen zusammensetzbare Eisenverbindung; sie steht vermutlich dem Methämoglobin in der Zusammensetzung nahe und ist dreiwertig. Ob die kolloidale Löslichkeit dabei für das Wachstum der I.B. eine Rolle spielt, oder ob durch die bakterielle Tätigkeit das anorganische Eisen zu einer organischen Verbindung aufgebaut wird, läßt sich noch nicht nach diesen Versuchen entscheiden.

Mit meinen Annahmen stehe ich nicht allein, und es sei gestattet, einige Literaturstellen anzuführen. Was zunächst die Diffusion der Stoffwechselprodukte aus den Bakterienleibern der Ammen betrifft, so kommt Luerssen „zu der Annahme, daß der das I.B.-Wachstum fördernde Stoff des Prodigiosus in den Bakterienleibern gebildet wird und erst nach ihrem Tode in die Umgebung diffundiert[1]), wenigstens in geeigneter Menge. Hierdurch wird auch erklärt, weshalb in Mischkulturen so selten Wachstum erfolgt." Es läßt sich auch jetzt Luerssens Befund erklären, daß tote Bakterien nur dem Nährboden zugemischt Wachstum der I.B. ergaben, dagegen nicht bei Aufstrich: die zugemischten Bakterien stehen nämlich unter dem Einfluß des umgebenden Agars und damit unter viel stärkeren Spannungsdifferenzen als die aufgestrichenen toten Bakterien. Letztere

1) Von mir gesperrt.

liegen auch mehr oder weniger vereinzelt und selten wohl in so großer Menge, wie in einer lebenden Mischkolonie. Ein etwaiges I.B.-Wachstum wird deshalb vielleicht nur durch Klatschpräparate mikroskopisch nachweisbar sein, von denen Luerssen nichts sagt. In meiner vorigen Arbeit (Centralbl. f. Bakt.) habe ich z. B. eine derartige nur mikroskopische sichtbare Ammenkolonie abgebildet. Die Diffusionsvorgänge sind zudem vermutlich viel geringer und gehen langsamer vor sich, als die der von allen Seiten von Agar umgebenen Bakterien. Die Bedingungen sind also für die aufgestrichenen toten Bakterien viel schlechter als für die dem Nährboden zugemischten. Auch Cantani vermutete nicht eine Modifizierung des Nährbodens selbst, sondern chemische Substanzen in den Bakterienleibern. Daß allerdings auch Veränderungen des Nährbodens selbst beim Ammenwachstum eine Rolle spielen können, habe ich in meiner Arbeit über das Ammenwachstum zeigen können.

Erklärbar erscheint jetzt, wo die Wichtigkeit des Eisens als bewiesen anzusehen ist, auch der Unterschied zwischen der Wirksamkeit der verschiedenen Verdünnungen von Blut in flüssigen und festen Nährböden. Die Annahme der katalytischen Wirkung kann auch hier fortfallen und an ihre Stelle tritt das Gesetz der oligodynamischen Wirkung der Metallsalze (Nägeli, zit. nach Süpfle), zu dessen Erklärung Adsorptionsvorgänge herangezogen werden; durch diese werden gelöste Metallsalze auf der Oberfläche der Keime konzentriert, und das hat die Wirkung, daß die Keime in ihrer unmittelbaren Umgebung das Schwermetall weit konzentrierter enthalten, als es eigentlich dem Lösungsverhältnis des Metallsalzes in der übrigen Lösung entspricht.

Zusammenfassung.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß R. Pfeiffers frühere Ansicht, daß das wesentliche Moment des Blutfarbstoffes in seinem Eisengehalt beruht, auch noch neben der jetzt angenommenen Rolle der Vitaminwirkung zu Recht besteht. Der V-Faktor läßt sich z. Zt. noch nicht näher definieren; der X-Faktor aber ist zu definieren als (wahrscheinlich organische) Eisenverbindung, die sowohl aus Blut, wie aus Pflanzen stammen kann, aber auch aus Bakterien, die irgendwie anorganisches Eisen in ihren Körper aufgenommen haben. Diese Körperbestandteile diffundieren nach dem Tode der betreffenden Bakterien (Ammenkeime) in den Agar und werden hier von den I. B. aufgenommen und zum Körperaufbau verwendet. In der Asche gewaschener I.B. läßt sich dreiwertiges Eisen nachweisen. Durch diese Befunde ist die Wachstumsförderung durch dem Nährboden zugesetzte tote Keime zu erklären, denn auch in der Asche der Ammenkeime ließ sich Eisen nachweisen, wenn sie auf Levinthal-Agar gezüchtet wurden. Ferner ist nachgewiesen, daß in dem auf gewöhnliche Weise hergestellten Agar sehr häufig Eisen in Spuren vorhanden ist, woraus sich die Differenzen bei den Angaben von Cantani und Neisser einerseits und den Nachprüfungen andererseits erklären lassen. Es wird zum Schluß darauf hingewiesen, daß die oft angenommene katalytische Wir-

kung des roten Blutfarbstoffes unwahrscheinlich ist, und daß statt dessen die oligodynamische Wirkung der Metallsalze in Anrechnung zu bringen sein dürfte.

Literatur.

1) Lieske, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 49. — 2) Süpfle, Münch. Tierärztl. Woch. Jahrg. 71. 1920. Nr. 16. — Die übrige Literatur findet sich am Schluß der II. Mitteilung (Centralbl. f. Bakt. z. Zt. im Druck.)

Mikrophotogramm: Klatschpräparat einer Mischkolonie von I.B. und Luftkokken.

Nachdruck verboten.

Ueber das angebliche Auftreten unspezifischer Ergebnisse bei der Untersuchung von Tuberkuloseseren mit der Bruckschen Reaktion.

Bemerkung zu der Arbeit von **Isabolinski** und **Gitowitsch**.

[Aus der Dermatologischen Abteilung des städtischen Krankenhauses (Prof. C. Bruck) in Altona.]

Von Dr. **Becker**.

Isabolinski und Gitowitsch halten auf Grund ihrer Untersuchungsergebnisse die Bruckscheˇ Reaktion ungeeignet für die Serodiagnose der Lues, da die Reaktion nicht spezifisch für Syphilis sei, sondern auch bei anderen nicht syphilitischen Erkrankungen, speziell bei Tuberkulose, positive Resultate ergibt. Ihre Ausstellungen an der von Bruck empfohlenen Methode beruhen auf der Untersuchung von insgesamt 250 Seren, darunter 46 Seren von Tuberkulose. Mit nur 65 Proz. Uebereinstimmung der Bruckschen Reaktion mit der Wassermannschen Reaktion und 32 Proz. unspezifischer Ausschläge bei der Bruckschen Methode stehen Isabolinski und Gitowitsch in so krassem Gegensatz zu den bisher erschienenen Veröffentlichungen anderer Autoren über die BR., daß es uns angebracht erscheint, die bisherigen Ergebnisse kurz zusammenzustellen (s. Tab. S. 288).

Es stehen somit der Gesamtzahl von ca. 26000 Untersuchungen mit ca. 91 Proz. Uebereinstimmung 250 Untersuchungen von Isabolinski und Gitowitsch mit 65 Proz. Uebereinstimmung gegenüber. Von allen Autoren wird die BR. durchweg als hochspezifisch, teilweise sogar der WR. an Spezifität überlegen bezeichnet. Häufiges Auftreten unspezifischer Ergebnisse, speziell bei Tuberkulose, wird von keinem der Autoren, mit Ausnahme von Isabolinski und Gitowitsch, beobachtet.

Das Auftreten unspezifischer Reaktionen bei Tuberkulose und Tuberkuliden wurde anfangs nach der Entdeckung der WR. auch bei dieser von einzelnen Autoren (Weil, Elias, Braun u. a.) festgestellt, konnte aber bei Verbesserung der Methode einer eingehenden Kritik nicht standhalten. Torvit u. Vas, E. Hoffmann, Jadassohn, Zieler, R. Müller, Klausner, Beron, Schönfeld u. a. finden sämtlich bei teilweise großen Untersuchungsserien nur ganz ausnahms-

Tabelle I.

	Zahl der Untersuchungen	In Uebereinstimmung	Spezifität
Becker[1])	12 179	98,3 Proz. m. WR.	spezifisch, unspezif. BR. 0,1 %, WR. 0,2 %
Grütz	2 000	87,3 „ „ „	spezifisch
Kreßler	2 000	93,1 „ „ „	„
Bruck	1 500	98,6 „ „ „	„
Zeißler	1 031	93.0 „ „ „	„
Stern	1 020	90,0 „ „ „	„
Fabian	821	92,6 „ „ „	„
Behrmann	808	88,6 „ „ „ u. MTR.	„
Bohne	793	98,0 Proz. m. WR.	„
Schubert	606	94,7 „ „ „	„
Jaehnke	500	91,8 „ „ „	„
Kyrieleis	500	90,8 „ „ „	„
Krechel	396	88,3 „ „ „	„
Matsuo	375	88,0 „ „ „ u. MTR.	„
Isabolinski u. Gitowitsch	250	65,0 Proz. m. WR.	unspezifisch 32 Proz.
Meszadimenki u. Berg	204	80.3 „ „ „	spezifisch
Teichmann	150	84,0 „ „ „	„
Perkel u. Israelsen	—	91,0 „ „ „	„
Killian	—	82,5 „ „ „	„

weise schwach positive Ergebnisse bei der WR., alle stärker positiven Reaktionen entpuppten sich schließlich doch noch als Lues.

Bei 265 von uns in letzter Zeit angestellten Paralleluntersuchungen von Tuberkuloseseren mittels der WR. und BR. konnten wir die hohe Spezifität beider Reaktionen für Lues völlig bestätigen. Es folgen kurz die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen mittels Wassermannscher Reaktion (Kaup) und der Bruckschen Reaktion:

Tabelle II.

WR. negativ BR. negativ	241 Fälle WR. 0, BR. 0		
WR. positiv BR. „	1 Fall WR. 0—+, BR. 0—+		Keine Lues
	4 Fälle „ 0—+, „ +		2 Fälle Lues, 2 Fälle keine Lues
	4 „ „ +, „ +		2 „ „ 2 „ „ „
	3 „ „ +++, „ +		2 „ „ 1 Fall „ „
	3 „ „ ++++, „ +		3 „ „
	1 Fall „ ++++, „ ++		1 Fall „
WR. positiv BR. negativ	4 Fälle WR. +,	BR. 0	4 Fälle keine Lues
WR. negativ BR. positiv	3 Fälle WR. 0,	B. +	3 Fälle Lues
	1 Fall „ 0,	B. ++	1 Fall Lues

1) Inzwischen ist unsere Untersuchungszahl bei gleichen Ergebnissen auf ca. 25000, also etwa der 100fachen Anzahl der Untersuchungen wie bei Isabolinski und Gitowitsch angestiegen. Als Komplementbindungsreaktion zum Vergleich diente die Methode nach Kaup.

Bei 5 Fällen (1,9 Proz.) mit schwach positiver WR. und schwach positiver BR. konnte klinisch und anamnestisch keine Lues festgestellt werden, bei allen anderen Fällen mit teils positiver, teils negativer WR. und positiver BR. konnte einwandfrei Lues nachgewiesen werden. Außerdem ergaben noch 4 Fälle, bei denen keine Lues festgestellt werden konnte, schwach positive WR. bei negativer BR.

Im ganzen wurden bei der BR. 7,6 Proz. positive Resultate bei Tuberkulose gefunden, von denen sich 5,7 Proz. als für Lues spezifische und 1,9 Proz. als unspezifische Resultate erwiesen. Bei der WR. dagegen erhielten wir bei Tuberkuloseseren insgesamt 7,0 Proz. positive Resultate, von denen 3,57 Proz. anscheinend unspezifisch waren.

Von einem gehäuften Auftreten positiver Reaktionen bei der Bruckschen Reaktion im Vergleich zur WR. kann nach unseren Untersuchungsergebnissen also durchaus nicht die Rede sein, da die Brucksche Reaktion nur halb so viel unspezifische Reaktionen wie die Wassermannsche Methode zeigte.

Diese kurze Zusammenstellung ergibt, daß die auffallenden Resultate von Isabolinski und Gitowitsch nicht in dem Wesen der Bruckschen Reaktion liegen, sondern nur in der Ausführung oder in der Auswertung durch den Untersucher zu suchen sein können. Da man bei der Einfachheit des Bruckschen Verfahrens wohl technische Fehler von seiten der Untersucher ausschließen darf, so bleibt zur Erklärung der abweichenden Resultate Isabolinskis und Gitowitschs nur die Annahme möglich, daß der Grund in der Verschiedenheit des untersuchten Krankenmaterials zu suchen ist, insofern als unter der osteuropäischen Bevölkerung die anamnestische Klärung latenter Luesfälle mit weit höheren Schwierigkeiten zu rechnen haben dürfte, als dies in Westeuropa der Fall ist. Besteht diese Annahme zu Recht, so würden die Ergebnisse von Isabolinski und Gitowitsch nichts anderes beweisen, als daß mit Hilfe der BR. weit mehr latente und besonders spätlatente Luetiker zu eruieren sind, als mit Hilfe der allein angestellten WR., eine Tatsache, die mit unseren eigenen Erfahrungen durchaus in Einklang steht und deren Bedeutung von uns schon früher besonders betont worden ist (Becker, Ztsch. f. Immf.). Die Ergebnisse der von Isabolinski und Gitowitsch bei der Smolensker Bevölkerung angestellten Versuche können uns daher nur von dem Wert der BR. überzeugen, nicht von dem Gegenteil.

Nachdruck verboten.

Einige Versuche zur Gewebsantisepsis bei Staphylokokkeninfektionen.

[Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung des Städt. Hygien. Universitäts-Instituts in Frankfurt a. M.]

Von **R. Nodake**, Tokio.

Durch die Untersuchungen von Conrad Brunner, v. Gonzenbach und Ritter, J. Morgenroth und seinen Mitarbeitern, von Neufeld, Schiemann und Reinhardt, von Braun, Feiler und

Goldschmidt ist gezeigt worden, daß die Prüfung der Wundantiseptika im Tierexperiment von Wichtigkeit ist.

Bei der Bedeutung, welche Staphylokokken bei menschlichen Wundinfektionskrankheiten einnehmen, ist natürlich die Prüfung der Wunddesinfektionsmittel gerade gegen diese Infektionserreger nötig. Darauf haben mit Recht in jüngster Zeit Neufeld und Conrad Brunner hingewiesen. Schon vor vielen Jahren sind Wunddesinfektionsversuche mit Staphylokokken an Kaninchen ausgeführt worden, so z. B. von Meßner und Henle. Diese Autoren infizierten die Tiere entweder mit staphylokokkenhaltigem Menscheneiter oder mit Kulturen dieser Mikroorganismen. Nun sind diese Wundinfektionserreger in sehr verschiedenem Grade gegenüber Kaninchen virulent. Außerdem sind ausgedehnte Prüfungen an Kaninchen wegen der Kostspieligkeit schwer durchführbar.

Morgenroth hat vor einiger Zeit zusammen mit seinem Mitarbeiter Wreschner die Bearbeitung dieser Frage in Angriff genommen und eine Methode zur Prüfung der Antiseptika bei Staphylokokkeninfektionen angegeben. Die Autoren fanden, daß 20stündige Serumbouillonkulturen von Staphylokokkenstämmen nach der Injektion unter die Bauchhaut bei Mäusen regelmäßig progrediente Phlegmonen hervorrufen, die nach 24 Std. schon stark ausgebildet sind und bei Abimpfung auf Blutplatten dichten Bakterienrasen mit hämolytischer Aufhellung geben und sich je nach der Stärke der Infektionsdosis über 1 Woche halten. Die Mäuse wurden nach 24 Std. oder höchstens nach 3 Tagen getötet und bakteriologisch untersucht. Morgenroth und Wreschner verwendeten stets 1:10 verdünnte Kulturen, von denen sie 0,2 ccm subkutan in der Mittellinie des Bauches injizierten. Nach den Angaben der Autoren haben die Staphylokokkenphlegmonen häufig nach wenigen Tagen zu einer Nekrose der Haut über den Phlegmonen geführt.

Auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Braun habe ich einige chemo-therapeutische Versuche mit Staphylokokken ausgeführt, über die ich im folgenden kurz berichten möchte:

Zunächst haben wir untersucht, ob die Mäusevirulenz der Staphylokokken durch verschiedene Züchtungsverfahren und nach verschiedener Zeit Schwankungen unterworfen ist.

Staphylokokkenstämme, aus Furunkeleiter gewonnen, die monatelang bis über ein Jahr auf gewöhnlichem Agar gezüchtet wurden, erwiesen sich in der Mehrzahl der Fälle virulent und die Größe der Phlegmonen unterschied sich nicht von der durch frische Stämme hervorgerufenen. Bei frisch gewonnenen Staphylokokkenstämmen erwies es sich als unwesentlich für die Erhaltung der Virulenz, ob sie auf gewöhnlichem Nährboden (Nährbouillon, Nähragar) reingezüchtet und weitergeführt worden sind oder ob sie auf serumhaltigen oder bluthaltigen Nährböden reingezüchtet und in Serumbouillon weitergeführt wurden. Im allgemeinen wurden größere Phlegmonen durch subkutane Injektion von 0,2 ccm der Verdünnung 1:2 bis 1:5 Pferdeserumbouillon hervorgerufen. Verdünnungen 1:10 und stärkere erzeugten entweder gar keine oder sehr geringe eitrige Infiltrate. Als Beispiel möge folgender Versuch angeführt werden:

Stamm No. 200, aus einem Furunkeleiter am 15. IV. 24 auf Kaninchenblutagarplatte gezüchtet, wurde weiterhin in Serumbouillon geführt. 24std. Serumbouillonkultur dieses Stammes wurde am 17. IV. in verschiedenen Verdünnungen

subkutan Mäusen injiziert: 2 Mäuse erhielten 0,2 ccm der Verdünnung 1:10, 2 Mäuse 0,2 ccm der Verdünnung 1:5, 2 Mäuse 0,2 ccm der Verdünnung 1:2 und 2 Mäuse 0,2 ccm der unverdünnten Serumbouillonkultur. Resultat am 18. IV.: die beiden mit der Verdünnung 1:10 injizierten Mäuse zeigten keinerlei eitrige Infiltrate. Die mit der Verdünnung 1:5 injizierten Tiere wiesen eitrige Infiltrate auf, die am nächsten Tage zum größten Teil vertrocknet waren und keinerlei Fortschreiten auch in den nächsten Tagen zeigten. Die mit der Verdünnung 1:2 injizierten Tiere zeigten am 18. IV. große Infiltrate, die am nächsten Tage bereits größtenteils vertrocknet waren und keinerlei Fortschreiten zeigten. In den nächsten Tagen vernarbten die Substanzverluste. Alle Tiere blieben bei längerer Beobachtung ohne Krankheitserscheinungen am Leben.

So verhielt sich eine große Zahl der von uns untersuchten Staphylokokkenstämme. Von den mehrere Monate alten Stämmen zeigten einige nur eine sehr geringe Virulenz und erzeugten auch bei Verwendung unverdünnter Serumbouillonkulturen nur kleine Infiltrate.

Braun und R. Goldschmidt, R. Bieling haben bereits darauf aufmerksam gemacht, daß auch die Streptokokkenphlegmone der Maus in den allermeisten Fällen keine fortschreitende ist, daß die eitrigen Infiltrate häufig schon nach 24 Std. zum Stillstand kommen, in den nächsten Tagen keine Progredienz zeigen und in Gangrän des infizierten Gewebsteils übergehen. Diese Tatsache, die auch bei Staphylokokkeninfektionen an der Maus feststellbar ist, spricht dafür, daß der Mäuseorganismus eine erhebliche natürliche Widerstandsfähigkeit gegen die subkutane Infektion mit Staphylokokken und Streptokokken besitzt. Die recht beträchtlichen Infektionsdosen, die zum Erzielen der Phlegmonen erforderlich sind, verursachen eine akute Eiterung, die meist in kurzer Zeit zum Stillstand kommt und das Weiterwuchern der Mikroorganismen verhindert. Sobald also die natürlichen Schutzkräfte des Mäusekörpers mobilisiert sind, hört die lokale Infektionskrankheit auf. Damit man sich eine richtige Vorstellung von der Infektionsdosis macht, ist es nötig, sich die injizierte Keimzahl vor Augen zu führen. Keimzählungen haben uns gezeigt, daß in 1 ccm einer 24stündigen Bouillonkultur unserer Staphylokokkenstämme mindestens 1 Milliarde lebensfähiger Keime vorhanden war. In einem Versuch fanden wir sogar in 1 ccm 25 Milliarden Bakterien. Um ausgedehntere Phlegmonen zu erzielen, muß man nach unseren Erfahrungen 0,2 ccm der Verdünnung 1:2 bis 1:5 injizieren. Wenn wir den Keimgehalt in 1 ccm Serumbouillonkulturen auf 1 Milliarde einsetzen, werden bei der oben angeführten Infektionsdosis 20—100 Millionen lebensfähiger Keime injiziert. Die Tatsache, daß der Mäuseorganismus eine natürliche Widerstandsfähigkeit gegenüber der subkutanen Staphylokokkeninfektion besitzt, ist deshalb von besonderer Bedeutung, weil man bei chemotherapeutischen Versuchen darauf achten und die natürliche Immunität in Rechnung ziehen muß.

Wir haben die von uns benutzten Staphylokokken auch auf ihre Virulenz bei Meerschweinchen geprüft. Wir haben sie nach den Angaben von Langer intrakutan in die Bauchhaut eingesprizt, und zwar 0,1 ccm verschiedener Serumbouillonverdünnungen. Wir konnten auch hier zwischen frischen und alten Stämmen keinerlei besondere Unterschiede finden. Manche Stämme verursachten Furunkel auch in der Verdünnung 1:10, andere nur mit konzentrierter Kultur. Als Beispiel eines solchen Versuchs möge folgender angeführt werden:

Von einer Bouillonkultur des Staphylococcus aureus No. 3105, der vor einem halben Jahr aus einem Furunkeleiter gezüchtet wurde, ist am 26. III. 24 einem Meerschweinchen rechts und links oben 0,1 ccm der unverdünnten Kultur,

rechts und links in der Mitte 0,1 ccm der 1:5 verdünnten Kultur, rechts und links unten 0,1 ccm der Verdünnung 1:10 in die Bauchhaut injiziert worden. Am nächsten Tage zeigt das Tier an den Injektionsstellen keinerlei Erscheinungen. Nach 2 Tagen sind die oberen Injektionsstellen in erbsengroße Infiltrate umgewandelt. Die mittleren und unteren Injektionsstellen zeigen keinerlei Befund. Am 29. 3. wird derselbe Befund wie am Tage vorher erhoben. Am 30. 3. finden sich auch in den mittleren Infektionsstellen linsengroße Infiltrate. Die unteren zeigen nur traumatische Reaktion. Dieser Zustand bleibt in den nächsten 7 Tagen stationär. Am 8. 4. verschwinden die Entzündungserscheinungen und die Furunkel heilen ab.

Wir haben in chemo-therapeutischen Versuchen in der Versuchsanordnung von Morgenroth und Wreschner das Trypaflavin und Rivanol geprüft. In Uebereinstimmung mit diesen Autoren konnten wir an der Maus feststellen, daß das Rivanol eine viel stärkere Reduktion der Staphylokokken herbeiführt als das Trypaflavin. Unsere Versuchsanordnung unterschied sich von der von Morgenroth und Wreschner darin, daß wir die Abimpfung nicht mit Glasspatel vorgenommen haben, sondern ein Gewebsstückchen herausgeschnitten und dasselbe energisch auf einer Serumagarplatte verrieben. Wie schon C. Brunner und v. Gonzenbach und auch Braun und Goldschmidt beobachtet haben, ist das bloße Abstreichen mit Glasspatel nicht so zuverlässig wie das Verreiben eines Gewebsstückchens, weil dabei die Keime dem Nachweise entgehen. Darin liegt wohl der Grund dafür, daß Morgenroth und Wreschner bei ihren Versuchen mit Staphylokokken und Rivanol häufig eine Sterilisierung des Gewebes feststellten, während in unseren Versuchen in den meisten Fällen eine sehr beträchtliche Keimreduktion, aber keine vollständige Sterilisierung nachweisbar war. Als Beispiele mögen zwei Versuche folgen, der eine mit Trypaflavin, der andere mit Rivanol:

Am 7. 2. 24 wurden 12 Mäuse im Gewicht von 15—17 g mit 0,2 ccm einer Verdünnung 1:2 der Staphylokokkenbouillonkultur infiziert. Unmittelbar darauf wurde die Infektionsstelle bei 3 Mäusen mit 1 ccm physiol. Kochsalzlösung umspritzt, bei 2 Mäusen mit 1 ccm Trypaflavin 1:20000, bei 2 Mäusen mit Trypaflavin 1:10000, bei 2 Mäusen mit Trypaflavin 1:5000 und bei 3 Mäusen mit Trypaflavin 1:2000. Eine von den mit Kochsalz umspritzten wurde sofort getötet und ein Gewebsstückchen auf der Serumplatte ausgestrichen. Auf dieser wuchs ein Rasen von gelben Staphylokokken. Ebenso wurde eine Maus, die mit Trypaflavin 1:2000 umspritzt war, sofort getötet und wie die vorher erwähnte Kochsalzmaus verarbeitet. Auch von dieser wuchs am nächsten Tage ein Rasen von gelben Staphylokokken. Die übriggebliebenen Mäuse wurden am nächsten Tage (8. 2.) getötet und ein Gewebsstückchen von der Infektionsstelle auf Serumplatten verarbeitet. Von allen ergibt die Kultur reichlich gelbe Staphylokokken.

Eine Abtötung wurde also durch Trypaflavin nicht festgestellt. Töteten wir die umspritzten Tiere erst 4 Tage nach der Behandlung, so konnte selbst bei der Konzentration 1:2000 eine Abtötung der Staphylokokken durch Trypaflavin nicht festgestellt werden.

Von den Rivanolversuchen möge folgender mitgeteilt werden:

Die Versuchsanordnung des am 11. 2. 24 angesetzten Versuchs war ganz dieselbe wie die bei dem oben beschriebenen Trypaflavinversuch. Die sofort getötete, mit Kochsalz umspritzte Maus und die mit 1 ccm der Verdünnung 1:2000 Rivanol vorbehandelte und sofort getötete ergab bei der kulturellen Untersuchung reichlich Staphylokokkenkolonien. Am 12. 2. wurden alle übrigen Mäuse getötet und kulturell untersucht. Die beiden mit Kochsalz umspritzten Mäuse ergaben einen Rasen von gelben Staphylokokken, die mit 1 ccm Rivanol 1:20000 umspritzten einige Hundert Staphylokokkenkolonien, die mit der Verdünnung 1:10000 und 1:5000 behandelten Mäuse 20—50 Staphylokokkenkolonien, die mit 1:2000 umspritzent 5 bis 20 Kolonien auf der Platte.

Das Rivanol tötet also in der Konzentration 1:2000 Staphylokokken im Subkutanversuche an der Maus gut.

Wir haben nun geprüft, ob der Tierart bei der Abtötung der Staphylokokken irgendeine Bedeutung zuzuschreiben ist und wählten deshalb zu den chemo-therapeutischen Versuchen außer der Maus noch Meerschweinchen und Frösche.

Was zunächst die Meerschweinchenversuche betrifft, so erwies sich das Rivanol in stärkeren Konzentrationen auch bei dieser Tierart gegenüber Staphylokokken bei sofortiger Umspritzung nach der Infektion wirksam. Wir konnten eine starke Keimreduktion feststellen.

Die Meerschweinchen wurden mit einer Staphylokokkenbouillonkultur subkutan am Rücken infiziert und dann sofort mit Rivanollösungen umspritzt. Bei Injektion von 1 ccm der Verdünnung 1:1000 des Rivanols gelang es in wiederholten Versuchen, eine bedeutende, wenn auch nicht vollständige Abtötung der Staphylokokken nach 24stünd. Einwirkung nachzuweisen.

Wir wollen jetzt die an Fröschen ausgeführten Versuche besprechen. Als Beispiel möge folgender geschildert werden:

Am 29. 4. 24 werden 12 Frösche subkutan unter der Brusthaut mit 0,2 ccm der 1:2 verdünnten Bouillonkultur vom Staphylococcus 2805 infiziert. Von diesen 12 Fröschen wurden 9 mit 1 ccm Rivanol 1:1000, 3 Frösche mit 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung umspritzt. Die Frösche haben wir am Tage vor dem Versuche in den Eisschrank gebracht, damit sich ihre Körpertemperatur auf die Eisschranktemperatur einstellt. Ein mit Rivanol umspritzter Frosch wurde sofort getötet und kulturell genau so, wie das bei den Mäusen geschildert worden ist, verarbeitet. Die Kultur ergibt am nächsten Tage einen Rasen von gelben Staphylokokken. Von den übrigen, mit Rivanol umspritzten Fröschen werden 4 sofort getötet und dann in den Eisschrank gelegt. Die 4 übriggebliebenen Rivanol-Frösche kamen lebend in den Eisschrank. Am nächsten Tage wurden dann auch diese Tiere getötet und alle 8 Rivanol-Frösche kulturell verarbeitet. Von den mit Kochsalz umspritzten Fröschen wurde ebenfalls ein Frosch am 29. 4. sofort getötet und kulturell verarbeitet. Er ergibt einen Rasen von gelben Staphylokokken. Von den zwei übriggebliebenen Kochsalz-Fröschen wurde das eine Tier sofort getötet, dann in den Eisschrank gelegt und erst am nächsten Tage kulturell verarbeitet. Das 3. Kochsalz-Tier kommt lebend in den Eisschrank, wird erst nach Ablauf von 24 Std. getötet und verarbeitet. Das Ergebnis dieses Versuchs war folgendes: Bei allen Kochsalz-Tieren ergibt die Kultur sehr reichlich Staphylokokkenkolonien. Die mit Rivanol umspritzten, sofort getöteten Frösche, die nach der Tötung 24 Std. im Eisschrank gelegen haben, zeigen bei der kulturellen Untersuchung keinerlei Abtötung der Staphylokokken. Von den mit Rivanol umspritzten, lebend 24 Std. im Eisschrank belassenen geht ein Tier spontan zugrunde. Von diesem Tier wachsen reichlich Staphylokokken. Die 3 übriggebliebenen, im Eisschrank lebend aufbewahrten Frösche ergeben folgendes: Von einem Tier sind sehr reichlich Staphylokokken gewachsen, bei den zwei anderen ist eine geringe Keimreduktion feststellbar.

Wiederholungsversuche ergaben analoge Ergebnisse. Frösche, die mit Rivanol umspritzt waren und 24 Std. im Eisschrank lebend gehalten wurden, zeigten bei der kulturellen Untersuchung eine geringe Keimreduktion, während die sofort nach der Umspritzung getöteten und 24 Std. im Eisschrank gehaltenen Tiere keine Abtötung aufwiesen.

Aus diesen Versuchen ergibt sich also, daß bei Fröschen, die mit stärkeren, bei Mäusen gut wirksamen Konzentrationen von Rivanol behandelt bei Eisschranktemperatur lebend gehalten waren, nur eine sehr geringe Reduktion der Staphylokokken nachweisbar war und daß das Rivanol unter denselben Bedingungen völlig versagte, wenn die Tiere tot waren.

Versuche, die wir mit Streptokokken an Mäusen ausgeführt haben, haben ähnliches Ergebnis gezeitigt wie die Froschversuche. Wurden Mäuse mit einem phlegmonebildenden Streptococcus unmittelbar nach der Infektion mit 1 ccm Rivanol 1:2000 umspritzt und die Tiere nach 24 Stunden kulturell untersucht, so zeigte sich ihr Gewebe sehr häufig keimfrei. Wurden aber die Mäuse unmittelbar nach der Umspritzung

mit Rivanol getötet und im Eisschrank bis zum nächsten Tag aufbewahrt und nachher kulturell untersucht, so enthielt das Subkutangewebe massenhaft Streptokokken. Es zeigen also diese Versuche, daß auch die gegen Rivanol sehr empfindlichen Streptokokken nicht abgetötet werden, wenn die Mäuse tot bei Eisschranktemperatur gehalten werden.

Für das Versagen des Rivanols am toten, bei Eisschranktemperatur aufbewahrten Tiere könnten zwei Faktoren verantwortlich gemacht werden: Einmal das Fehlen der Lebenstätigkeit der Körperzellen und der Resorption der Keime im toten Tier und zweitens die niedrige Temperatur.

Was die Rolle der Temperatur betrifft, so müssen wir ihr beim Ausfall dieser Versuche die Hauptrolle zuschreiben. Man kann sich nämlich durch Reagenzglasversuche ohne weiteres davon überzeugen, daß starke Rivanolkonzentrationen, z. B. 1:2000, bei Eisschranktemperatur keinerlei Abtötung von Streptokokken und Staphylokokken zeigen, während bei 37° eine starke Abtötung feststellbar ist. Das ist eine Tatsache, die uns aus der Desinfektionslehre längst bekannt ist: Man müßte ihr auch bei chemo-therapeutischen Versuchen Aufmerksamkeit schenken. Es würde sich empfehlen, zur Erhöhung der antiseptischen und chemo-therapeutischen Wirkung heiße Lösungen zu verwenden und die Temperatur in der Wunde künstlich zu erhöhen.

Ob bei dem Versagen des Rivanols in den obigen Versuchen neben der niederen Temperatur auch noch das Fehlen der Lebenstätigkeit der Zellen und der Resorption der Keime eine gewisse Rolle spielt, kann aus diesen Versuchen nicht mit Bestimmtheit gefolgert werden, wenn auch die Möglichkeit zugegeben werden muß.

Literaturverzeichnis.

Bieling, Chemotherapie und innere Desinfektion. Dtsch. med. Woch. 1923. Nr. 33. S. 1090.) — Braun, H., Zur Prüfungsmethodik der Wundantiseptika im Tierexperiment. (Klin. Woch. 1922. Nr. 16. S. 761.) — Braun, H., und Goldschmidt, Versuche über die Wirkung von Trypaflavin und Rivanol gegen Erdinfektion. (Bruns Beitr. zur klin. Chir. Bd. 130.) — Brunner, C., Handbuch der Wundbehandlung. (Neue dtsch. Chir. Bd. 20. 1916.) — Brunner, v. Gonzenbach u. Ritter, Experimentelle Untersuchungen über Erdinfektion und Antiseptik. (Bruns Beitr. z. klin. Chir. Bd. 111. 1918. S. 672.) — Brunner u. v. Gonzenbach, Weitere experimentelle und klinische Untersuchungen über chemische Wundantiseptik, speziell Tiefendesinfektion. Die Akridinderivate Trypaflavin und Rivanol. (Ibid. Bd. 130. S. 225.) — Feiler, Zur Prüfungsmethodik der Wundantiseptika im Tierexperiment. (Dtsch. Ztschr. f. Chir. Bd. 164. 1921. S. 379.) — Henle, Ueber Desinfektion frischer Wunden. (Arch. f. klin. Chir. Bd. 49. 1895. S. 835.) — Langer, Die Grundlagen der biologischen Desinfektionsleistung von Akridiniumfarbstoffen, insbesondere von Flavicid. (Ztschr. f. d. ges. experim. Med. Bd. 27. 1922. S. 174.) — Meßner, Experimentelle Studien über die Wundbehandlung bei infizierten Wunden. (Verhandl. d. Dtsch. Ges. f. Chir. 23. Kongreß. 1894.) — Morgenroth, Ziele und Wege der chemo-therapeutischen Antisepsis. (Klin. Woch. 1922. S. 352.) — Ders. u. Wreschner, Ueber chemo-therapeutische Antisepsis. 5. Mitteil.: Die Wirkung des Rivanols auf Staphylokokken. (Dtsch. med. Woch. 1923. S. 1322.) — Neufeld, Die experimentellen Grundlagen der Wunddesinfektion. (Arch. f. klin. Chir. Bd. 121. 1922. S. 326.) — Reinhardt, Ueber experimentelle Wundinfektion und Wunddesinfektion an Meerschweinchen und Mäusen mit Hühnercholerabazillen, Pneumokokken und Streptokokken. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 95. 1922.)

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über einen Erreger der ägyptischen Augenentzündung (Koch-Weekssches Bakterium) und seine Beziehungen zum Pfeifferschen Influenzabazillus.

V. Mitteilung.

[Aus der Staatl. Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Erlangen.]

Von Privatdozent Dr. med. **Maximilian Knorr**, Oberarzt der Anstalt, und Dr. med. **Walther Gehlen.**

Mit 3 Abbildungen im Text.

Das Wachstum der hämophilen Keime in pflanzlichen Nährmitteln.

(Zugleich ein Beitrag zur Frage des Vitaminbedarfs der Bakterien.)

Allgemeines über das Wachstum von Keimen in pflanzlichen Nährmitteln. Die ersten Untersuchungen über die Wirkung von Pflanzengeweben auf das Wachstum der Bakterien verdanken wir Th. Smith (1890), der lebendes Pflanzengewebe zur Züchtung von Anaërobien empfahl. Wrzosek konnte 15 Jahre später zeigen, daß auch sterilisierte Gewebstücke völlig dazu geeignet sind. Der Zusatz von Pflanzengewebe geschah also zunächst nur wegen seiner reduzierenden Eigenschaften, aber man hat auch noch früher, lange vor dem Aufkommen der Vitaminlehre, Pflanzengewebe als Nährmittel für Hefe und Bakterien verwendet. Wir dürfen nur an die Bedeutung der Kartoffelkulturen im Anfang der bakteriologischen Aera erinnern. Später lag es nahe, die oft schwer erhältlichen tierischen Bestandteile der Nährmittel durch pflanzliche zu ersetzen. Solche Arbeiten, die nur vom Ersatzgedanken geleitet wurden, finden sich schon um 1900, es sei nur auf die umfassende Darstellung von L. Heim (Lehrbuch der Bakt. 6. u. 7. Aufl.) verwiesen. Wir finden, um nur einiges zu erwähnen, daß Rochaix auf Mohrrübenagar Wachstum, wenn auch nur schwaches, von Di-Bazillen und Pneumokokken verzeichnete, daß Guth unter anderen auch Streptokokken auf Bohnenextraktagar züchtete und daß schon mit Rüben, Aepfeln, Birnen, Bananen, Artischocken, Pilzen aller Art, Auszügen von Weizen, Gerste, Roggen, Hafer, Erbsen, Linsen usw. dauerndes Wachstum auch anspruchsvoller Krankheitserreger erzielt wurde.

Neben diesen zahlreichen mehr empirischen Arbeiten findet man gleichzeitig auch da und dort Studien über die Ursachen des Zustandekommens von Hefe- und Bakterienwachstum in pflanzlichen Nährmitteln[1]).

In neuerer Zeit haben besonders amerikanische Autoren diesen Fragen umfangreiche Untersuchungen gewidmet. Das wichtigste Ergebnis konnten wohl Davis, Thjötta und Avery buchen, die gezeigt haben, daß die den Hämophilen das Wachstum ermöglichenden

1) Die einschlägigen Schriften werden später besprochen, dort auch Literaturverzeichnis. [Weichardts Ergebn. Bd. 7.]

V- und X-Stoffe des Blutes auch durch Pflanzengewebe ersetzt werden können.

Wir haben diese Feststellungen zunächst nur zur weiteren Prüfung der Artgleichheit der Influenza- und der Koch-Weeks-Bazillen heranziehen wollen. Da aber die früher von Knorr unternommenen Versuche, das Zustandekommen des Wachstums von Keimen mit hochgestellten Nährmittelansprüchen durch vitaminähnliche Stoffe zu erklären, mit Fusobakterien, später mit Meningokokken, nicht zum erstrebten Ziele führten, schien der durch die Feststellung von Davis, Thjötta und Avery gegebene Weg aussichtsreicher. Wir haben nämlich hier die Möglichkeit, die für das tierische Leben so eingehend bearbeiteten akzessorischen pflanzlichen Stoffe in ähnlicher Weise auch für die zu diesem Zweck besonders geeigneten hämophilen Keime zu untersuchen.

I. Das Wachstum der Hämophilen in Flüssigkeiten nach Zusatz frischer Kartoffelstückchen.

1) Ist es möglich, hämophile Keime dauernd in gewöhnlichen und eiweißfreien Nährflüssigkeiten nach Zusatz steriler Pflanzengewebe zu züchten?

Davis stellte fest, daß auf einem Hämoglobinagar mit Zusatz von Pflanzengeweben, besonders im lebenden Zustand, ein üppigeres Wachstum eintritt als auf Hämoglobinagar allein. Thjötta und Avery griffen diese Beobachtung auf. Die beiden zum Wachstum der I.B. unbedingt nötigen Stoffe der r. Bl. V und X wurden nun auch im Pflanzengewebe gesucht. Die Autoren ließen sich dabei von der Beobachtung leiten, daß ein auffallender Parallelismus zwischen der positiven Benzidinreaktion bei Blutderivaten und wachstumsfördernden Eigenschaften besteht, worauf schon Olsen hingewiesen hatte. Da nun in erster Linie der X-Faktor für die Benzidinreaktion verantwortlich gemacht werden muß, lag die Annahme nahe, daß mit Hilfe dieser Farbreaktion auf Peroxydasen auch X-Körper pflanzlichen Ursprungs gefunden werden können. Die Sorge um die gleichzeitige Anwesenheit des V-Körpers war unnötig, da dieser Stoff nach den Arbeiten von Davis, Thjötta und anderen in jeder Pflanze vorkommt. Die Autoren benützten zunächst rohe sterile Kartoffelstückchen, da sie starke Benzidinreaktion gaben, als Zusatz zu gewöhnlicher Nährbrühe und zu eiweißfreien Lösungen (Uschinsky). Aber es genügte auch der Zusatz unerhitzter Kartoffeln zu einer Flüssigkeit, die nur Na- und K-Phosphat enthielt. Das Uebertragen einer der Wachstumsfaktoren mit dem Impfmaterial ist nach Angabe der Autoren auszuschließen, da das Wachstum nicht nur wie bei Hefeextraktzusatz auf die 1. Zucht beschränkt bleibt, sondern „fortgesetzt" zu erzielen sei. Benützt wurden vorzugsweise alte Kartoffeln.

Die Nachprüfung dieser Versuche ergab zunächst eine Bestätigung. Es konnten KWB. und IB. in 5 dann freiwillig unterbrochenen Passagen gezüchtet werden. Aus äußeren Gründen mußten die immerhin im Beginn mühevollen Untersuchungen aufgegeben werden, und als sie später (April 1923) wieder begonnen wurden, wollte eine Fortführung über 7 Passagen hinaus nicht gelingen. Aber gerade die von den Amerikanern nicht näher beschriebenen „fortgesetzten" Züchtungen sollten in erster Linie auf geraume Zeit ausgedehnt werden, um den einwandfreien Nachweis des normalen Gedeihens der Keime in solchen Nährmitteln zu erbringen. (Fig. 1.)

Wie folgender Stammbaum zeigt, gelingt es dauernd, KWB. wie IB. in eiweißfreier Tyrodelösung nach Zugabe von sterilen rohen Kartoffelstückchen zu züchten (Zeit: 11. 11. 23 bis 11. 2. 25).

Erklärung zum Stammbaum: 0 = nicht gewachsen, × = so schwach gewachsen, daß Weiterführung aussichtslos, • = verunreinigt. Die römischen Zahlen bezeichnen die einzelnen Reihen jedes Stammes, die arabischen die Zahl der laufenden Zuchten.

Technik. Gute Kartoffeln werden mit Seife und Bürste in heißem fließenden Wasser gründlich gereinigt, dann die Schale und ungefähr $^1/_2$ cm des Fleisches entfernt, nochmals gründliches Abspülen unter heißem fließenden Wasser, Einlegen in Reibschale und mit ca. 10 ccm Alkohol Uebergießen. Der Alkohol wird verbrannt und während des Abbrennens die Kartoffel stets gedreht. Dadurch verkleistert nochmals eine Fleischschicht von einigen Millimetern. Mit sterilem Messer wird nun die Kartoffel halbiert. Auf der Innenfläche werden ca. 1 cm lange, 3 mm breite und ebenso dicke Stückchen herausgeschnitten und in die jeweilige Lösung gebracht. Der Ausfall infolge Verunreinigung betrug durchschnittlich 5 Proz.

Wir haben stets kleine Reagenzgläschen benützt, die mit ungefähr 2,5 ccm der jeweils geprüften Lösung beschickt waren. Die Ueberimpfungen wurden am 4. oder 5. Tage nach Aussaat vorgenommen. Ausgesät wurde stets nur eine 1 mm-Oese (Drahtstärke 0,3 mm). Kontrollen in gewöhnlicher Tyrodelösung und Brühe allein werden bei den einzelnen Versuchen nicht eigens angeführt. Bei der angegebenen Art der Beimpfung waren in den Kontrollen nur einige Male nach 24 Std. Keime noch nachweisbar, später nie mehr. Auch in diesen Fällen war die Lösung nie trüb, und es handelte sich zweifellos nur um die eingeimpften Keime.

Der Nachweis des Wachstums wurde stets durch Aussaat einer 2 mm-Oese auf Levinthal-Agar nach Aufwirbeln der Kultur erbracht, bei ausgebliebenen Züchtungen durch Ueberimpfung des Kartoffelstückes in neue Lösung und nochmalige Aussaaten. Auch in Levinthal-Brühe wurde zur Kontrolle ausgesät, ohne jedoch dadurch eine feinere Kontrolle wie auf Agar zu haben. Die Kontrollaussaaten müssen stets 48 Std. bebrütet werden, da nicht selten Wachstum erst nach 24 Std. auftritt.

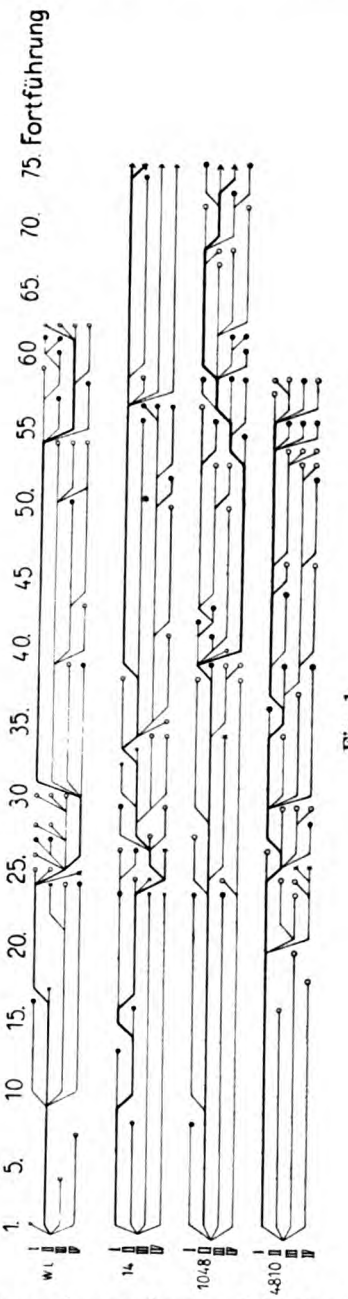


Fig. 1.

Ergebnisse.

1) Wir mußten somit 4 Stämme in je 4 Reihen anlegen, um nach rund 60 Passagen noch 2 Stämme im Versuch zu haben. Von jeweils 4 Züchtungen war um diesen Zeitpunkt von 4 Stämmen nur je eine Zucht noch am Leben. — 2) Die nicht gewachsenen Zuchten der später nicht weiter fortführbaren Stämme WL und 4810 verhalten sich zu denen der überlebenden Stämme 14 und 1048 rund wie 2:1. Da ferner die Zahl der verunreinigten Kulturen bei allen 4 Stämmen fast gleich ist, darf man auch annehmen, daß durch dieses Verhältnis nicht Zufälligkeiten, sondern Eigenschaften der Stämme

ausgedrückt werden. Die Zahl der Keime von WL und 4810, die mit den in der Kartoffel enthaltenen Wachstumsstoffen auskamen, war anscheinend geringer als die von 14 und 1048. — 3) Dies kommt nun auffallenderweise ungefähr von der 23. Zucht ab, auch in geringerem Maße bei den bis heute durchgeführten Stämmen 14 und 1048 zum Vorschein. Die Kartoffeln waren um diesen Zeitpunkt (Februar) 4 Monate gelagert. Wir haben seit dieser Zeit bei allen Stämmen öfters ausbleibendes Wachstum verzeichnet, daß bei WL und 4810 so häufig wurde (Juli), daß schließlich ungefähr um die gleiche Zeit beide Stämme ausliefen. In der Folgezeit machte nur noch der Stamm 1048 einige Schwierigkeiten, Stamm 14 nicht. Doch sahen wir auch bei diesen Stämmen eine auffallende Abnahme der Wachstumsintensität. Die in den ersten 20 Passagen schon am 2. Tage nach der Beimpfung auftretende kräftige Trübung nahm immer mehr ab, selten machten einige Fortführungen eine Ausnahme. Ueber die 50. Passage hinaus war aber das Wachstum nahezu stets so dürftig, daß mit bloßem Auge die geglückte Ueberführung nur erraten werden konnte, erst die positive Aussaat auf Levinthal-Agarplatte brachte Gewißheit. Als wir die ersten neuen Kartoffeln erprobten, sahen wir dagegen gleich wieder das üppigste Wachstum. Wir haben uns bei diesen Feststellungen nicht nur auf unser Auge verlassen müssen, die stets gleiche Aussaat zur Kontrolle bestätigte unser Urteil. Während früher ein zusammenhängender Rasen anging, waren nunmehr zählbare Kolonien die Regel. Unseren Levinthal-Agar kann man dafür nicht beschuldigen[1]). — 4) Morphologisch zeigten die Keime in allen Züchtungen normales Aussehen. Degenerations- und Involutionsformen finden sich erst in älteren Kulturen in demselben Maße wie bei entsprechenden Levinthal-Kulturen.

Wir haben auf die mikroskopische Kontrolle stets großen Wert gelegt, weil die normale Form der Keime bei solchen Untersuchungen von ausschlaggebender Bedeutung ist. Bei der Schwierigkeit, physiologische Messungen bei Hämophilen vorzunehmen, ist die Form der einzige sichere Beweis neben Stärke der Vermehrung und Lebensdauer, den wir zur Behauptung, daß sich das Leben in unseren Nährmitteln in normalen Grenzen abspielt, heranziehen können. Derartige Untersuchungen bilden so den Gegensatz zur Unterernährung (Minimalernährung), bei der wir häufig „pathologische" Formen auftreten sehen, wie aus den eingehenden Versuchen von Braun und Cahn-Bronner über den Verwendungsstoffwechsel pathogener Keime hervorgeht. Daß ferner durch Reize verschiedener Art der Bau des Keimes weitgehend beeinflußt werden kann, haben Braun und Schaeffer bei Proteusbakterien durch die bis zur Einstellung der Geißelbildung getriebene Ektoplasmaschädigung gezeigt; es sei auch auf meine Photogramme solcher Involutionsformen in der Arbeit von J. v. Soden verwiesen. Vielleicht sind es gerade Stoffe mit akzessorischen Eigenschaften, die die normale Form gewährleisten.

Wir können somit annehmen, daß in den Kartoffeln die zum Wachstum der „hämophilen" Keime nötigen Stoffe vorhanden sind, jedoch

1) Wir kennen keine Zufälle mehr, die manche Operationsnummern ausschließen oder verschlechtern, seitdem wir das defibrinierte Blut frisch verwenden und es sofort zu dem aus dem Dampftopfe genommenen Agar geben, bis zum Schäumen aufkochen, kurze Zeit das Gerinnsel absitzen lassen und dann filtrieren. Das Filtrieren hat so kaum Schuld an dem leidigen Mißraten, wie Fildes meint.

nicht so günstig wie im Levinthal-Agar, so daß Stämme, wie WL, der an und für sich für Störungen in der optimalen Nährmittelzusammensetzung öfters empfindlich war, den Versuchsanordnungen entsprechend nur eine Zeitlang durchgeführt werden können.

Bei diesen Ergebnissen haben wir im Schrifttum nach Arbeiten gesucht, die sich mit der Veränderung der Kartoffeln beim Altern beschäftigen. Wir fanden bisher nur bei Wieland eine Angabe, wonach der Gehalt der Kartoffeln an Vitaminen selbst im Vergleich zu dem Gehalt hervorragender Vitaminquellen (Hefe für Faktor B, Apfelsine für C) ansehnlich erscheint. Wenn auch nach Wieland über die Verteilung der Vitamine in den Knollen keine Arbeiten vorliegen, so darf man doch in Analogie mit den Feststellungen bei anderen Pflanzen annehmen, daß Vitamin B in den zellreicheren Außenschichten vorhanden ist (Osborne-Mendel), also für uns nicht so in Frage kommt, wie Vitamin C. Osborne und Mendel konnten einen Unterschied im B-Vitamingehalt bei alten und neuen Kartoffeln nicht feststellen. Ueberwinterte Kartoffeln sind aber nach Wieland ärmer an Vitamin C als frische[1]).

2) Welche Stoffe müssen in den eiweißfreien Flüssigkeiten enthalten sein, damit die Zugabe von frischen Kartoffelstückchen noch wachstumsfördernd wirkt?

Die Tyrodelösung hat in 1000 ccm dest. Wasser:

1. NaCl	8,0 g	5. $NaHCO_3$	1,0 g
2. KCl	0,2 „	6. NaH_2PO_4	0,05 „
3. $CaCl_2$	0,2 „	7. Traubenzucker	1,0 „
4. $MgCl_2$	0,1 „		

Wir haben nun die Kartoffelstückchen in Lösungen gebracht, die nicht alle diese Bestandteile enthielten, und versucht, in möglichst einfachen Lösungen unsere Stämme in Passagen zu züchten. Nach Thjötta und Avery können IB. in einer Natrium-Kaliumphosphatlösung nach Zusatz der Kartoffelstückchen gedeihen; wie lange, geben die Autoren jedoch nicht an. Wir haben gefunden:

a) 1 + 5 + 7 gestatteten ein Wachstum der Stämme WL, 14 und 1048 vom 6. 1. bis 19. 2. 1924 in 8 bzw. 9 Zuchten. Wir gaben die Fortführung freiwillig auf. — b) 1 + 5 ermöglichten die Züchtung der Stämme WL, 14, 1048 und 4810 vom 12. 3. bis 1. 4. 24 in je 4 Passagen. Dann freiwillig aufgegeben. — c) In NaCl-Lösung allein (PH 6,8) konnte WL. vom 26. 5. bis 23. 6. 24 in 6 dann freiwillig aufgegebenen Passagen gezüchtet werden. Entsprechend kürzere Zeit 14 und 1048 in 4 Passagen, die dann auch abgebrochen wurden. Wir fügen an, daß uns in 2 gleichen Versuchen mit 2 Monate gelagerten Kartoffeln, nach Einstellung der Lösung auf PH 7,4, mit n/10 Na_2CO_3 nur je einmal die Züchtung von WL und 1048, nie von 14 und 4810 bei je 4 Aussaaten glückte. — d) In dest. Wasser allein gingen nach Zusatz von 6 Monate gelagerten Kartoffeln die Stämme WL, 14, 1048 und 4810 bei je 6maliger Aussaat nicht an.

Somit scheint gewöhnliche 0,8proz. NaCl-Lösung nach Zusatz frischer Kartoffelstückchen zur Fortführung unserer Keime zu genügen.

Es ist so möglich, daß in der Kartoffel allein sämtliche zum Wachstum der hämophilen Keime nötigen Stoffe, nicht nur V und X, enthalten sind. Wir kennen aber noch keinen Weg, aus diesen Stoffen

1) Wir möchten damit ausdrücklich nicht ohne weiteres das Vitamin C mit wachstumsfördernden Stoffen für Hämophile gleichsetzen. Es mußte aber, wie auch aus den weiteren Versuchen hervorgeht, auffallen, daß sich die Kartoffeln in verschiedenen Zuständen ähnlich, wie wir es aus Tierversuchen kennen, in bezug auf das Leben der Hämophilen verhielten.

ein praktisch brauchbares Nährmittel machen zu können. Die Hauptschwierigkeit liegt in der geringen Widerstandsfähigkeit der Vitamin C ähnlichen Stoffe gegen Alkalien und, wie wir später zeigen werden, in der noch nicht völlig geklärten Wirkung der Kartoffelfermente außerhalb der Zellen (z. B. im Preßsaft) auf diese Körper.

3) Wie lange bleiben die hämophilen Keime in Tyrodelösung mit frischen Kartoffelstückchen am Leben?

Verschiedene Autoren haben den Gehalt eines Nährmittels an vitaminähnlichen Stoffen mit der längeren Lebensfähigkeit der darin gezüchteten IB. in Zusammenhang gebracht. Für Kartoffeln und pflanzliche Stoffe überhaupt liegen noch keine entsprechenden Untersuchungen vor. Es verhielt sich die Zahl der wieder herausgezüchteten Stämme zu der der ausgesäten:

a) Brutschrank aufgehoben[1]):

nach 6 Tagen:	16. 8. 23	Infl. 2:2	KWB. 2:2
	3. 2. 24	„ 8:8	„ 8:8
	27. 3. 24	„ 8:8	„ 7:7
	4. 5. 24	„ 8:8	„ 8:8
nach 8 Tagen:	16. 8. 23	„ 2:2	„ 2:2
	3. 2. 24	„ 8:8	„ 8:8
	4. 5. 24	„ 6:7	„ 7:8
nach 10 Tagen:	16. 8. 23	„ 1:1	„ 2:2
	6. 1. 24	„ 6:8	„ 3:8
	3. 2. 24	„ 7:7	„ 8:8
	4. 5. 24	„ 6:7	„ 7:8
nach 12 Tagen:	16. 8. 23	„ 1:2	„ 0:2
	3. 2. 24	„ 8:8	„ 7:8
	4. 5. 24	„ 5:7	„ 7:8
nach 15 Tagen:	27. 12. 23	„ 4:7	„ 2:6
	4. 5. 24	„ 4:7	„ 6:8
nach 19 Tagen:	4. 5. 24	„ 4:7	„ 3:8
nach 21 Tagen:	4. 5. 24	„ 3:7	„ 1:8

b) nach 6 Tagen Brutschrank und 3 Tagen Z.T.[2]) und Tageslicht, also insgesamt 9 Tagen

2. 6. 24 IB. 4:8 KWB. 2:7

c) nach 4 Tagen Brutschrank und folgenden Tagen bei Z.T. und im Dunkel

9. 6. 24			
6 Tage	IB.	4:7	KWB. 4:7
8 „	„	2:7	„ 1:7
9 „	„	1:7	„ 2:7
10 „	„	0:7	„ 2:7
12 „	„	0:7	„ 2:7

Vergleichen wir diese Zahlen mit den bei Blutnährflüssigkeiten erhaltenen, so finden wir keine großen Unterschiede. In Blutbrühe nach Levinthal finden sich die Keime häufig bis zum 9. Tage noch lebensfähig, nach anderen Autoren sogar 14—18 Tage, gleichviel, ob die Kulturen bei 37° oder bei Z.T. aufbewahrt wurden. In Blutgelatine hat Knorr nicht selten noch nach 6 Wochen bei 37° lebende Keime (IB. und KWB.) gefunden.

Auffallend ist, daß die Keime bei Z.T. eher eingehen als bei 37°. Wir führen dies zunächst darauf zurück, daß die die wachstumsfördernden Stoffe zerstörenden Fermente bei Z.T. am stärksten wirken können.

1) Datum = Tag der Beimpfung. Verunreinigte Kulturen wurden nicht gezählt.
2) Z.T. = Zimmertemperatur.

II. Das Wachstum der hämophilen Keime nach Zusatz getöteter Kartoffelzellen.

1) Tötung der Zellen durch Hitze.

1. Versuch.

a) In Tyrodelösung werden Stückchen von Kartoffeln gegeben, die ca. 10 Monate gelagert sind. Erhitzung $^1/_2$ Std. im strömenden Dampf. Die mehrmalige Aussaat von 4810, 6375, WL und 14 ist erfolglos. — b) In gewöhnliche Nährbrühe werden Stückchen von Kartoffeln gegeben, die ca. 1 Jahr gelagert sind. Erhitzung $^1/_2$ Std. im strömenden Dampf. Von den ausgesäten Stämmen 4810, 14 und WL gingen nur 4810 in einer Zucht an. — c) Wiederholung des Versuches a) mit den Kartoffeln von b), aber nur 5 Min. lange Erhitzung im strömenden Dampf. Von den ausgesäten Stämmen 4810, 14 und WL ging nur in einer Aussaat WL an. — d) Versuch a mit 2 Monaten gelagerten Spätkartoffeln 1048 und 14 wurden bis zur 5. Passage gezüchtet.

2. Versuch.

a) In Tyrodelösung werden Kartoffelstückchen gegeben, die von 8 Monate gelagerten Kartoffeln stammen. 10 Min. Erhitzung in kochendem Wasserbad (Fig. 2a). — b) Wie in Versuch a), aber Stückchen von 10 Monate gelagerten Kartoffeln (Fig. 2b). — c) Wie in Versuch a), aber Stückchen von nur 2 Monate gelagerten Kartoffeln (Fig. 2c).

Wir haben noch weitere Versuche mit Erhitzung der Kartoffelstückchen gemacht, die ähnliche Ergebnisse zeitigten. Es besteht somit kein Zweifel, daß die durch Hitze getöteten Zellen der Kartoffeln ebenso wie die lebenden ein dauerndes Wachstum der Koch-Weeks- wie Influenzabazillen unterhalten können.

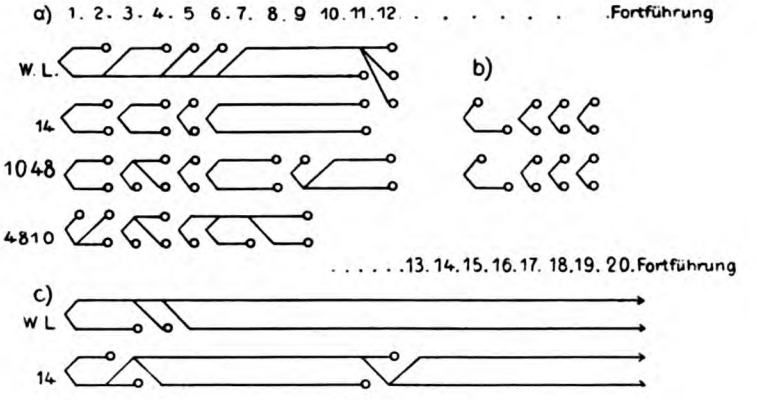


Fig. 2.

Nach all dem, was wir schon über die V-Stoffe berichteten, ist das schwierigere Anzüchten und Weiterführen der Stämme in diesen Versuchen nicht verwunderlich. Entsprechend der Dauer der Erhitzung nehmen die V-Stoffe ab, und die dadurch hervorgerufene Verringerung der wachstumsfördernden Stoffe kann nur durch Vermehrung der Aussaaten jedes Stammes in gewissen Grenzen ausgeglichen werden. Wir nehmen aber an, daß die aus äußeren Gründen nur in 2 Reihen ausgesäten Stämme in a) und b) auch ausgeblieben wären, wenn wir je 4 oder mehr Reihen angelegt hätten.

Hervorheben möchten wir, daß mit neuen erhitzten Kartoffeln die Versuche ebenso leicht durchzuführen waren, wie die gewöhnlichen Reihen mit frischen unerhitzten Kartoffelstückchen. Auch das Wachstum war in den Versuchen mit neuen erhitzten Kartoffeln

ausgesprochen stärker als mit alten erhitzten Kartoffeln. Wir kommen deshalb zur gleichen Annahme wie im Abschnitt I: Durch die Erhitzung der an Vitamin C ärmeren alten Kartoffeln werden die wachstumsfördernden Stoffe eher zerstört als bei den neuen Kartoffeln. Je stärker die Erhitzung, desto besser wird dieser Unterschied nachweisbar. Für die stufenartige Abnahme des Vitamins C durch Erhitzung sprechen auch die durch Tierversuche belegten Angaben im Schrifttum.

2) Tötung der Zellen durch Trocknung.

1. Versuch. a) Stückchen von 8 Monate gelagerten Kartoffeln werden in Reagenzgläser gegeben und dann bei 37° während der angegebenen Zeit getrocknet Fig. 3a). — b) Versuch wie in a) mit 6 Monate gelagerten Kartoffeln (Fig. 3b). — c) Versuch wie in a) mit Frühkartoffeln (Fig. 3c).

Außer den angeführten Versuchen haben wir auch ähnliche mit Kartoffelstückchen, die bei 40° während 7 Std. im Faust-Heim und bei 50—55° während der gleichen Zeit im Vakuum bei 40 mm Druck getrocknet waren, angestellt. Wir hatten jedoch hierbei immer große Verluste durch Verunreinigung, so daß wir erst später auf diese Versuche zurückkommen möchten.

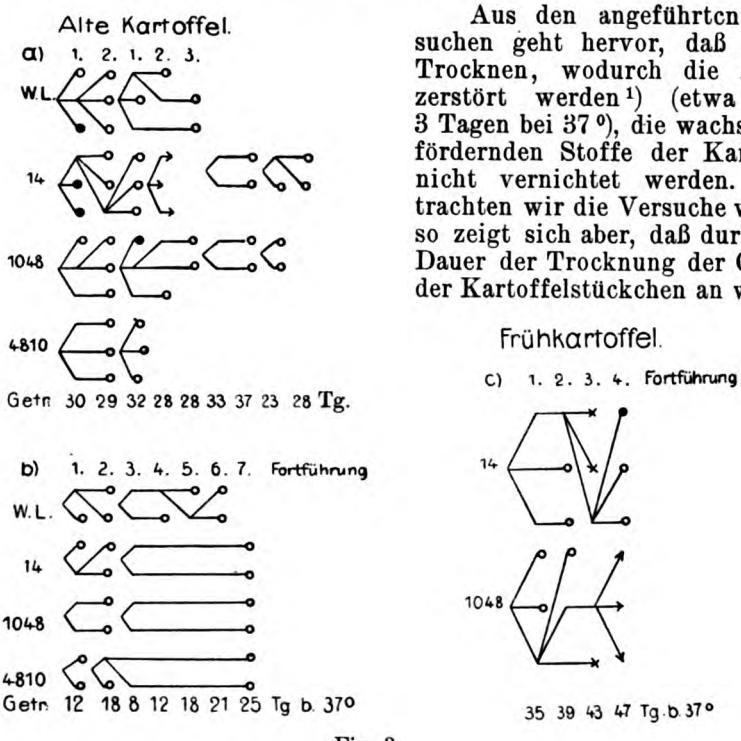


Fig. 3.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß durch Trocknen, wodurch die Zellen zerstört werden[1]) (etwa nach 3 Tagen bei 37°), die wachstumsfördernden Stoffe der Kartoffel nicht vernichtet werden. Betrachten wir die Versuche weiter, so zeigt sich aber, daß durch die Dauer der Trocknung der Gehalt der Kartoffelstückchen an wachstumsfördernden Stoffen abnimmt. Wir haben uns auch in weiteren Versuchen zum Versuch b) überzeugt, daß fast durchweg schon die ersten Passagen in über 25 Tage getrockneten Stückchen nicht mehr angingen. Neue Kartoffeln scheinen nun eine längere Trocknungszeit

1) Herrn Prof. Dr. K. Noack sind wir für die Untersuchung der getrockneten Kartoffelstückchen auf lebende Zellen zu besonderem Danke verpflichtet.

zu vertragen als alte, wie aus Versuch c) hervorgeht, wo selbst mit 47 Tage getrockneten Stückchen bei 1048 in der 4. Passage durchweg ein sehr üppiges Wachstum eintrat, das erst in der 5. Passage mit 53 Tage getrockneten Kartoffeln ausblieb. Zusatz von Zitronensaft 1:200 zu diesen Kartoffeln gestattete jedoch die weitere Fortführung. Auch aus diesen Versuchen gewinnen wir so den Eindruck, daß eine dem Vitamin C ähnliche Substanz für das Wachstum verantwortlich zu machen ist. Die geringere Resistenz des Vitamin C der Kartoffel gegen Trocknung ist bekannt (z. B. Givens-Cohen u. a.). Entsprechend den Angaben von Holst und Frölich, daß die antiskorbutische Eigenschaft von Kartoffeln bei Z.T. schneller verloren geht als bei 37°, müssen diese Versuche ergänzt werden.

3) Versuche mit Zellsaft der Kartoffeln.

Hier müssen zunächst die Arbeiten von Fildes besprochen werden. Fildes hat — allerdings nur mit einem Stamm (IB. der Nationalsammlung) — eingehende Versuche mit Kartoffelpreßsäften angestellt. Sie bezweckten, die von Thjötta und Avery gegen die Peroxydase-Theorie erhobenen Zweifel zu widerlegen. In dieser Richtung müssen wir später auf die Arbeit von Fildes zurückkommen; hier interessiert nur die Wirkung der erhitzten und nicht erhitzten Kartoffelpreßsäfte auf das Zustandekommen des Wachstums der Influenzabazillen.

Fildes trieb geschälte Kartoffeln durch eine Zerkleinerungsmaschine, dann durch eine „Presse". Er erhielt so eine stärkehaltige, braune Flüssigkeit, die mit der gleichen Menge Kochsalzlösung verdünnt wurde. Hierauf Filtration durch Papier, grobes „englisches Berkefeld" und Berkefeld N. Gab er nun 1 ccm dieses Saftes zu 10 ccm „Baktopeptonwasser", das V-frei ist, so war die Flüssigkeit alkalisch (PH 7,6). Nach Beimpfung mit einer Kochsalzaufschwemmung bekam er nach 24 Std. Bebrütung Wachstum.

Unsere Technik unterscheidet sich von der von Fildes durch die Gewinnung des Preßsaftes bei 300—350 Atm., Verdünnungen dieses Saftes mit Tyrode, 1proz. Witte-Peptonlösung oder Nährbrühe[1]) und Aussaat nach 48std. Bebrütung auf Levinthal-Agar. Nach Zusatz des Preßsaftes hatte die Flüssigkeit PH 7,2—7,4, also eine für IB. optimale Reaktion.

1. Versuch mit 8 Monate alten Kartoffeln. Da die Verdünnung des Preßsaftes 1:5 mit dest. Wasser die Benzidinreaktion auch nach Filtration stark positiv gab, wurde der Saft im gleichen Verhältnis zu einer 1proz. Peptonwasserlösung gegeben. Diese Mischung war entsprechend unseren früheren Beobachtungen infolge des Peptongehaltes benzidinnegativ. Die Lösung wurde zunächst mit einer 2 mm-Oese aus Kartoffeltyrodekultur beimpft.

WL, 14, 1048 2mal ausgesät, 0mal zurückzüchtbar. Wir nahmen nun an, daß vielleicht die Aussaatmenge zu gering sei, und verrieben eine 1mm-Oese einer gut gewachsenen Levinthal-Kultur in 1 ccm Kochsalzlösung und beimpften die Preßsaftmischung mit einer 2 mm-Oese aus dieser Aufschwemmung.

WL 2mal ausgesät, 1mal zurückzüchtbar; 14, 1mal ausgesät, 0mal zurückzüchtbar; 77 2mal ausgesät, 1mal zurückzüchtbar; 6718, 1048, 4810, 4855, 6593 je 2mal ausgesät, 0mal zurückzüchtbar.

2. Versuch mit 3 Monate altem Kartoffelpreßsaft. Der Saft wurde diesmal unverdünnt durch Kieselgur auf Knorr-Ganzglasfilter geschickt und danach mit Nährbrühe 1:4 verdünnt. Beimpfung mit einer 2 mm-Oese aus NaCl-Aufschwemmungen von Levinthal-Kulturen.

WL verunreinigt, 14 auch aus 2. Fortführung bei 2tägigen Zwischenräumen zurückzüchtbar, 4810 steril, 6375 s. 14.

3. Versuch wie bei 2., nur Berkefeld-Filter. WL steril, 14 wie bei Versuch 2, 4810 aus 2. Fortführung zurückzüchtbar, 6375 aus 1. Aussaat zurückzüchtbar.

4. Versuch: Die Röhrchen für obige Versuche standen 24 Std. im Brutschrank zur Prüfung auf Keimfreiheit. Wir haben dann mit Röhrchen, die außerdem noch 6—8 Tage bei Z.T. standen, die Versuche 2 und 3 mit den gleichen Stämmen wiederholt. Niemals konnte Wachstum festgestellt werden, obwohl jeder Stamm 5mal ausgesät wurde.

1) Die beiden Flüssigkeiten wurden 1 Std. bei 120° sterilisiert, um V- und X-Körper zu entfernen.

5. Versuch. Da unsere laufenden Reihen (s. oben) meist Kartoffelstückchen in Tyrodelösung enthielten, haben wir auch den Preßsaft von 1 Monat gelagerten Kartoffeln 1:20 mit Tyrodelösung verdünnt. Nach Filtration durch Kieselgur auf Knorr-Ganzglasfilter noch positive Benzidin- ud Biuretreaktion[1]). Obwohl wir die Beimpfung mit NaCl-Aufschwemmung wie oben vornahmen und die Stämme WL, 14, 1048, 4810 je 4mal aussäten: niemals Wachstum.

6. Versuch: Zu 100 ccm dest. Wasser und zu 100 ccm 1proz. Peptonlösung werden je 20 ccm Kartoffelpreßsaft (Frühkartoffel) zugesetzt. Filtration durch Kieselgur auf Ganzglasfilter nach Knorr. Im Preßsaft ohne Pepton und mit Pepton ist die mehrmalige Aussaat von 14 erfolglos. Stamm 1048 dagegen konnte bei jeweils 4tägiger Ueberzüchtung bis zur 4. Passage geführt werden.

Es gelang uns somit nicht, durch Zusatz von Kartoffelpreßsaft zu den üblichen Flüssigkeiten diese zu einem Nährboden für die IB. und KWB. zu machen, auf dem auch nur ein mit den bisherigen Ergebnissen bei frischen Kartoffelstückchen einigermaßen vergleichbares Wachstum ermöglicht worden wäre. Unser Ergebnis braucht nicht im Widerspruch zu dem von Fildes zu stehen, da Fildes nicht angibt, wieviel Reihen er in seiner Preßsaftflüssigkeit gezüchtet hat. Knorr hat schon erwähnt, daß die bei der etwa 10—20 Std. währenden Herstellung einsetzenden Oxydationen den wachstumsfördernden V-Stoff vernichten können.

Die Ergebnisse sprechen in der gleichen Weise wie die bisherigen für die Vitaminnatur der wachstumsfördernden Stoffe. Funk gibt an, daß Meerschweinchen und Kaninchen, obwohl sie zu der Grundnahrung frischen Kartoffelsaft erhielten, nach 36 Tagen eingingen. Nach Funk scheinen die Vitamine im natürlichen Zustand stabiler zu sein als in Form von Extrakten oder Preßsäften.

Bezssonoff fand die antiskorbutische Wirkung nur bei intakten Kartoffeln, nach Zerquetschung war sie kaum mehr vorhanden.

Neben der Reaktion des Substrats spielt die Oxydation in Gegenwart der Luft für Vitamin C eine große Rolle (vgl. auch die Ergebnisse von Delf). Nach Heß und Unger vermag auch die Gegenwart von Kupfer die Wirkung des Vitamins C katalytisch zu zerstören.

Auch diese Ergebnisse der Vitaminforschung sind gut mit unseren Versuchen in Einklang zu bringen. Es wäre so denkbar, daß auch die katalytische Eisenwirkung bei unserer Preßsaftbereitung (Stahlpresse, Messer!) im Sinne von Heß und Unger zerstörend auf V gewirkt haben mag. Wir sind deshalb dazu übergegangen, jede Metallwirkung bei der Bereitung der Preßsäfte auszuschließen. Auch die Zeit, die immer bei der Herstellung der Säfte verstreicht, muß verringert werden. Man wird deshalb die sonst unerläßliche Bebrütung der Nährflüssigkeiten aufgeben und auf gut Glück die frisch bereiteten Nährmittel beimpfen müssen. Die Aufbewahrung des Saftes muß am besten gänzlich unterbleiben oder die Reaktion so sauer gemacht werden, daß Oxydasen nicht wirken können. Am besten wird zu jeder Generation frisch bereiteter Saft verwendet. Wir haben diese Vorsichtsmaßregel in unseren Versuchen nicht streng durchgeführt, da unsere Fragestellung zunächst nur die wachstumsfördernde Wirkung toter und lebender Zellen bzw. des Preßsaftes betraf. Erst später fiel uns auf, daß diese Stoffe in ihren Eigenschaften viel mit dem Vitamin C gemeinsam haben.

1) Wir mußten nach der Literatur annehmen, daß der V-Körper biuretpositiv ist oder wenigstens an einen biuretpositiven Körper gebunden ist (Kalkbrenner, Olsen u. a.). Andererseits sprachen die Angaben von Agulhon und Legroux u. a. dagegen, nunmehr auch die Aehnlichkeit des V-Körpers mit Vitamin C, das wasser- und alkohollöslich ist.

Gerade dafür waren die negativen Versuche mit dem Preßsaft lehrreich.

Hervorzuheben ist, daß es im Versuch 6 mit Preßsaft von Frühkartoffeln, allerdings in niedriger Verdünnung, gelungen ist, einen Stamm sogar in 2 Reihen bis zur vierten Zucht zu führen. Wir können uns das nur so erklären, daß der Einfluß des Fermentgehaltes oder vielleicht besser die Fermentaktivität bei nicht gelagerten Kartoffeln sehr gering ist. Dafür sprechen unsere Versuche, die zeigten, daß z. B. die Peroxydasen bei der Keimung zunehmen. Wir könnten uns sonst nicht erklären, wie die Ueberzüchtung der 3. Passage in einem alkalischen Preßsaftsubstrat, das überdies 24 Std. bebrütet und 12 Tage — wenn auch im Eisschrank — aufbewahrt war, noch erfolgreich sein konnte.

In anschließenden Versuchen suchten wir zu zeigen, daß die Wirkung dieser die V-Stoffe zerstörenden Fermente beträchtlich geringer ist, wenn die Fermente nicht in Preßsäften, sondern in den Zellen wirken.

Versuch a). Wir haben Kartoffelstückchen wie sonst von 2 Monate alten Kartoffeln in Tyrodelösung gegeben und dann 10, 12, 14, 15, 16 und 18 Tage bei 37° bebrütet. Es gelang uns, einen IB.- und 2 KWB.-Stämme (WL bezw. 1048 und 4810) auch noch mit 16 Tage bebrüteten Kartoffelstückchen fortzuführen, alle Stämme blieben aber aus, als 18 Tage bebrütete Stückchen genommen wurden. Dieser Versuch wurde 1 Jahr später in gleicher Weise mit je 2 Aussaaten von 1048 und 14 wiederholt. Am 17. Tage noch überall Wachstum, am 22. sämtliche Aussaaten negativ.

Versuch b). Wir haben dann stark keimende Kartoffeln zu derartigen Versuchen genommen. Aber der Ausfall war hier durch Verunreinigung (80 Proz.!) so, daß nur 2 Versuche zur Bewertung übrig blieben; dann waren alte Kartoffeln nicht mehr aufzutreiben. Wir haben die Kartoffelstückchen zunächst 24 Std. bei 37° in Tyrodelösung bebrütet und dann 3—6 Tage bei Z.T. aufbewahrt. Es gelang uns, nur Stamm 14 und 1048 bis zur 3. Passage zu bringen! Die Bräunung der Flüssigkeit, in der die Kartoffelstückchen waren, war teilweise sehr stark[1]).

III. Versuche, die wachstumsfördernden Stoffe aus den Kartoffeln zu gewinnen.

Unsere Mittel gestatteten es bisher nicht, die sonst üblichen Extraktionsverfahren zur Gewinnung der wachstumsfördernden Stoffe aus den Kartoffeln einzuschlagen. Wir haben deshalb zunächst versucht, mit dest. Wasser zum Ziel zu kommen.

1. Versuch. a) Kleine sterile Kartoffelstückchen von 2 Monate gelagerten Kartoffeln werden mit dest. Wasser übergossen und 6 Tage bei 37° gehalten. Abgießen auf Papierfilter. Filtrat benzidin- und biuretpositiv. Von diesem Filtrat werden einige Tropfen zu je 2 ccm Tyrodelösung bzw. Nährbrühe gegeben. WL, 14, 1048 und 4810 in keiner Züchtung trotz mehrmaliger Beimpfung angegangen (Versuch vom 13. 12. 23). — b) Tyrodelösung wird in Reagenzgläser abgefüllt, wie üblich mit frischen Stückchen 6 Monate gelagerter Kartoffeln versetzt und 24 Std. bebrütet. Entfernung der Stückchen und Beimpfung der Röhrchen.

WL wurde 4mal, 14 7mal ausgesät. Beide Stämme gingen nie an. 1048 wurde 6mal ausgesät und war 2mal aus der ersten Kultur zurückzüchtbar. Es gingen aber nur vereinzelte Kolonien auf, so daß Weiterführung aufgegeben wurde (Versuche Juni und Juli 1923). — c) Versuch b) mit frischen Kartoffeln und keim-

1) Die Bräunung der Kartoffelstückchen ist nach Angaben im einschlägigen Schrifttum auf die Wirkung einer Tyrosinase auf Tyrosin zurückzuführen. Der braune Farbstoff geht meist in die Nährflüssigkeit über. Diese Fermentwirkung ist selbst bei verschiedenen Stückchen aus einer Kartoffel nicht gleichmäßig stark. Sie hängt anscheinend gerade bei stark keimenden Kartoffeln von der Tätigkeit der Zellen ab, die herausgeschnitten wurden. Kurzes Kochen verhindert die Bräunung.

freier Filtration der Tyrodelösung nach 48 Std. Bebrütung mit Kartoffelstückchen. Beimpfung mit Kochsalzaufschwemmungen von WL, 14, 4810, 6375. Kein Stamm ging an. — d) Versuch b), aber 10 Min. Kochen der Röhrchen im kochenden Wasserbad. 14 und 1048 werden je 4mal ausgesät und sind je einmal zurückzüchtbar. — 2. Versuch. Frische Kartoffelstückchen (aus Kartoffeln vom Beet weg) werden mit einer dünnen Kollodiumhaut überzogen und dann in Tyrodelösung wie gewöhnlich gegeben. Beimpfung mit NaCl-Aufschwemmungen von WL, 14, 6375 und 4810. Kein Stamm gewachsen. — 3. Versuch. Es wurde auch versucht, ob die wachstumfördernden Stoffe der Kartoffel nicht in Agar diffundieren. Kartoffelscheiben wurden in Wasseragar so übergossen, daß der Agar ca. 1 mm über der Kartoffel stand. Beimpfung mit WL, 14, 4810, 6375, 1048. Versuche vom 3. 9. — 8. 11. 23 ohne Erfolg.

Aus diesen Versuchen glaubten wir schließen zu dürfen, daß die Stoffe der Kartoffel entweder nicht in genügender Menge durch Plasmolyse oder Diffusion aus den Zellen herauszubekommen oder außerhalb der Zellen sehr unbeständig ist.

Die beiden positiven Versuche mit Stamm 1048 (Versuch 1b) sprachen eher dafür, daß das Kummerwachstum durch noch vorhandene, makroskopisch nicht sichtbare Kartoffelteilchen unterhalten wurde. Ueber die Diffusion des Vitamins C durch Membranen und Gallerten sind uns Arbeiten nicht bekannt.

IV. Histologische Untersuchungen.

Wir haben nach diesen Ergebnissen seit 1923 histologische Untersuchungen der Stückchen aus positiven Kulturen vorgenommen, ohne dadurch über die Lagerung der Keime in den Kartoffeln Aufschluß zu erhalten.

Im Sommer 1924 wurden die Versuche wiederholt und von Herrn Privatdozent Dr. M. A. Busch die histologische Untersuchung der zu den Kulturen benützten Pflanzenteile ausgeführt. Herr Dr. Busch konnte aber weder in Kartoffel-, Bananen- noch Kokosnußstückchen Keime mit Sicherheit nachweisen, obwohl die Kulturen ganz üppig gewachsen waren. Wenn auch der Nachweis der kleinen Gebilde in Pflanzen überhaupt sehr schwer zu erbringen sein wird, so wäre doch ein üppigeres Wachstum in den Zellen dem Nachweis kaum entgangen.

V. Versuche, das Kartoffel- durch anderes Pflanzengewebe zu ersetzen.

Schon Davis, der Entdecker der wachstumsfördernden Wirkung pflanzlichen Gewebes für hämophile Keime, wies darauf hin, daß die Erscheinung nicht nur mit einer Pflanzenart erzeugt werden könne. Thjötta und Avery fanden sogar Bananen, die die Benzidinreaktion nicht gaben, wachstumsfördernd. Da wir die Bedeutung der Benzidinreaktion bei pflanzlichen Geweben in einem eigenen Abschnitt behandeln wollen, dürfen wir uns hier mit dem Hinweis auf unsere Arbeit „Ueber die Leistungsfähigkeit der Benzidinprobe zum Nachweis der Blutperoxydasen in bakteriologischen Nährmitteln“ begnügen, wonach die neg. Benzidinprobe keine sichere Gewähr für das Fehlen der Peroxydasen bietet.

1) Versuche mit Bananen.

Fildes behauptet, daß seine Peroxydasetheorie über den X-Körper durch die Feststellung Thjöttas und Averys, daß auch benzidinnegatives Bananengewebe wachstumfördernd wirkte, nicht erschüttert worden sei, da er auch hier Peroxy-

dasen fand. Wir haben deshalb zunächst mehrere Bananen mittels der Benzidinreaktion untersucht. Das Mark war stets benzidinnegativ; nur dieses kommt zum Gebrauch in frischem Zustande in Frage. Die Haut hatte zahlreiche benzidinpositive Stellen, kann aber wegen der starken Infektion des äußeren Teiles bei der geringen Dicke der ganzen Schale in keiner Weise zu derartigen Versuchen benützt werden.

Wir haben Bananenstückchen in der gleichen Weise wie Kartoffelstückchen steril entnommen und in Tyrodelösung wie gewöhnlich gegeben. Nach 24std. Aufenthalt im Brutschrank zur Probe auf Sterilität wurden je 2 Reihen von 14 und 1048 ausgesät.

Die Stämme konnten ohne Schwierigkeiten bis zur 8. Zucht fortgeführt werden. Das Wachstum war ebenso stark wie mit Frühkartoffeln (Ende August 24). Wir haben weitere Passagen bei den Preisen der Früchte und den Ausfällen infolge Verunreinigung nicht anlegen wollen, zumal das Ergebnis der beiden Reihen keinen Zweifel aufkommen ließ, daß Kartoffelgewebe durch Bananengewebe ersetzt werden kann.

2) Versuche mit Kokosnüssen und Kokosmilch.

Wir haben diese Versuche aus demselben Grund angestellt wie die mit Bananen: Das Fleisch der Nuß ist nur etwa 1 mm weit an der nach innen gelegenen Fläche benzidinpositiv, sonst benzidinnegativ. Die Milch ist dagegen stark benzidinpositiv. Wir haben nun zunächst sicher benzidinnegatives Gewebe in Tyrodelösung in gleicher Weise wie die Kartoffel- und Bananenstückchen gegeben.

Die Stämme 14 und 1048 konnten mühelos in 4tägigen Zwischenräumen in 8 Passagen in je 2 Reihen weitergeführt werden. Wir gaben aus dem gleichen Grunde wie bei den Bananen die weitere Prüfung auf.

Kartoffelgewebe kann also in gleicher Weise durch das benzidinnegative Gewebe der Kokosnuß ersetzt werden.

Die benzidinpositive Milch wurde mit Tyrodelösung 1:4 verdünnt und dann mit den Stämmen 14 und 1048 in je 2 Reihen beimpft. Wir brachten den Stamm 14 bis zur 4. Passage, 1048 nur bis zur 2., da die keimfreie Gewinnung des Saftes Schwierigkeiten machte und wir öfters die Kulturen mit Schimmelpilzen verunreinigt fanden, die auf unseren Kontrollnährmitteln kaum wuchsen. In der Kokosnußmilch sind V- und X-Stoffe in einer gut bearbeitbaren Form vorhanden.

Auch von der wachstumfördernden Eigenschaft des benzidinnegativen Knollengewebes der Canna indica haben wir uns überzeugt.

Somit steht fest, daß benzidinnegatives Pflanzengewebe ebenso wie benzidinpositives das Wachstum hämophiler Keime ermöglicht und Kartoffelgewebe voll ersetzen kann.

3) Versuche mit benzidinpositivem Pflanzengewebe.

Gelbe Rüben (Karotten) sind zu derartigen Versuchen schlecht geeignet, da man mit einem Ausfall von 60 Proz. infolge Verunreinigung rechnen muß. Wir haben anscheinend nur deshalb nicht über 3 Passagen anlegen können; denn das Wachstum tritt in Tyrodelösung mit Karottenstücken sehr bald und sehr kräftig ein. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Kartoffeln war bei Zusatz der frischen Stückchen zu 0,8proz. NaCl-Lösung mit und ohne Alkalisierung niemals, auch nicht in der 1. Aussaat, Wachstum zu erreichen (Versuche September 23).

Kohlrüben eignen sich aus denselben Gründen wie gelbe Rüben nicht zu derartigen Versuchen. Immerhin brachten wir es mit 14 und WL auf je fünf Zuchten, die 6. fielen immer wegen Verunreinigung aus. In Kohlrübenpreßsaft, 1:1 mit dest. Wasser verdünnt, dann wie üblich alkalisiert und filtriert, trat trotz je 4maliger Aussaat von WL, 14, 1048 und 4810 kein Wachstum auf.

Besprechung der Ergebnisse.

Influenza- (Koch-Weeks-) Bazillen können nach Zusatz frischer Kartoffelstückchen auch zu einer synthetischen Nährlösung dauernd weitergeführt werden, wie etwa auf Levinthal-Agar. Auch Zusatz der frischen Kartoffelstückchen zu einer gewöhnlichen phys. Kochsalzlösung scheint den Keimen zu genügen, obwohl die Reaktion der Flüssigkeit dann P_H 6,8—7,0 ist, bei der in Blutnährmitteln nichts

wächst. Somit sind die von Thjötta und Avery mitgeteilten Beobachtungen an ausreichenden Reihenversuchen geprüft und bestätigt.

Die Beobachtungen während dieser Wachstumsversuche veranlaßten uns, die Bedeutung akzessorischer Stoffe der Kartoffel für Hämophile zu untersuchen. Wir sind bei diesen Untersuchungen von dem Prinzip ausgegangen, die durch Tierversuche geprüften Eigenschaften der Kartoffel in ähnlicher Weise für hämophile Bakterien zu prüfen.

Während man bisher nur annahm, daß die Kartoffel für die Influenzabazillen akzessorische Stoffe enthalte (Vitamin A und B, Davis, Thjötta und Avery), sind wir dazu übergegangen, die Wirkungen von Erhitzen, Trocknen, Lagern und von Fermenten auf die akzessorischen Stoffe der Kartoffel an Bakterienversuchen zu zeigen. Die Beeinflussung der Vitamine durch derartige Faktoren ist für die Kartoffel durch zahlreiche Tierversuche belegt. Zunächst haben wir nur Influenza- (Koch-Weeks-) Bazillen herangezogen, in weiteren Versuchen über die Gleichheit der wachstumsfördernden Stoffe des Blutes und der Pflanzen sind auch die anderen Hämophilen (Bac. haemoglobinophilus canis und die hämolytischen Influenzabazillen) auf ihre Ansprüche an akzessorische Stoffe untersucht worden. Es geschah dies in der Weise, daß der nicht auf den Vitaminfaktor angewiesene Bac. haemoglobinophilus canis und die nur auf den Vitamin-, nicht auch auf den X-Faktor angewiesenen hämolytischen Influenzabazillen in Nährmittel geimpft wurden, die den auf beide Faktoren angewiesenen Influenza- (Koch-Weeks-) Bazillen infolge herbeigeführter Veränderung des notwendigen Vitaminfaktors nicht mehr genügten. Derartige Nährmittel eignen sich ebensogut zur Differentialdiagnose in der „hämophilen Gruppe" wie der Serum- oder Kohlekochblutagar nach Knorr. Wir sehen so, welch feine Indikatoren die Hämophilen für akzessorische Stoffe sind. Daß tatsächlich bei der Ernährung der Hämophilen akzessorische Stoffe von Bedeutung sind, geht aus den Arbeiten von Terada, Rivers und eigenen Versuchen hervor. Die Keime gedeihen nämlich auf einem hinsichtlich der Reaktion und des Agargehalts optimal eingestellten Kochblut-Wasseragar bei 5 Proz. Blutzusatz nicht, auch bei 10 Proz. nur spärlich (+). Es müssen erst bestimmte wirkliche Nährstoffe hinzukommen. Die Kartoffel und die anderen mit Erfolg geprüften Pflanzen müssen also sowohl die akzessorischen Stoffe als auch die Nährstoffe enthalten, die nur mit Hilfe der akzessorischen Stoffe verwendet werden können.

In vorliegender Abhandlung sollte hauptsächlich der V-Faktor der Pflanzen, insbesondere der Kartoffel, auf seine Eigenschaften näher untersucht werden.

In den 15 Monate weitergeführten Reihenversuchen mit der gleichen Sorte frischer Kartoffel zeigte sich nun deutlich der Einfluß der Lagerung. Gerade das Vitamin C, das in Frage kommen konnte, ist durch Lagerung beeinflußbar (Vedder, Wieland). Wir wissen, daß der Gehalt der Kartoffel an diesem Vitamin sehr groß ist und fast dem bekannt hohen Vitamin C-Gehalt von Apfelsinen, Zitronen und weißen Rüben gleichkommt (Givens-Mc Clugage, Delf, Chick, Humme-Skeleton, Chick-Rodes). Es ist auch nach Wieland anzunehmen, daß vor allem in den zu unseren Versuchen verwendeten Innenschichten gerade Vitamin C vorhanden ist.

Mit Zunahme der Lagerung nahm das Wachstum ab oder blieb aus.

Die bekannt große Empfindlichkeit des Vitamin C gegen äußere Faktoren überhaupt ermöglichte weitere Versuche mit erhitzten und getrockneten Kartoffelstückchen. Allerdings werden wir auch bei solchen Versuchen die gleichzeitige Einwirkung anderer schädigender Faktoren nicht ausschalten können. Es muß ein Unterschied sein, ob etwa Erhitzungsversuche mit alten oder neuen Kartoffeln angestellt werden. Alle schädigenden Einflüsse wirken entsprechend der vorhandenen Vitaminmenge.

Die Stabilität des C-Vitamins gegen Erhitzung ist besonders in alkalischen Lösungen, also in fast allen unseren Nährmitteln, gering. Bedenkt man, daß die Vitamin C schützende Schale in unseren Versuchen noch dazu wegfällt und daß die Stückchen sehr klein sind, so wird man selbst bei frischen Kartoffeln nach mehr als 30 Min. langer Erhitzung kein Vitamin C mehr annehmen können, besonders wenn nicht für Abwesenheit von Sauerstoff gesorgt ist (Givens-Mc Clugage). Es zeigte sich, daß 10 Min. währendes Kochen nur bei sehr lang gelagerten Kartoffeln schädigt, verwendet man nur 2—3 Monate gelagerte Kartoffeln, dann ist dauerndes Wachstum der Influenzabazillen möglich.

Langsam getrocknete Kartoffeln haben so gut wie kein Vitamin C mehr (Givens, Mc Clugage). Beim Trocknen soll ferner nach Holst und Frölich die antiskorbutische Wirkung bei Z.T. schneller verloren gehen als im Brutschrank bei 37°. Es wurde festgestellt, daß über 30 Tage bei 37° getrocknete alte Kartoffeln Wachstum nicht mehr ermöglichen; neue vertragen, vielleicht entsprechend ihres höheren Vitamin C-Gehalts, 10—15 Tage mehr.

Das Vitamin C ist auch in Säften ziemlich unbeständig. Für Kartoffelsaft wurde dies von Funk nachgewiesen. Entsprechend gelang es nicht, durch Zusatz von Preßsäften ein dauerndes Wachstum der Influenzabazillen zu erreichen. Angeblich spielt bei der Vitaminvernichtung die Oxydation in Gegenwart der Luft eine große Rolle (Funk). Sicher ist ferner, daß Fermente, besonders Oxydasen, das Vitamin C zerstören können. Besonders außerhalb der Zellen tritt die Zerstörung schnell ein, wie wir ja auch aus den Versuchen mit Preßsäften entnehmen können.

Auch innerhalb der Zellen ist diese Wirkung anzunehmen. Bebrütet man Kartoffelstückchen in den besonders geeigneten alkalischen Flüssigkeiten, dann ist durchschnittlich nach 22 Tagen die Aussaat der Influenzabazillen erfolglos. Entsprechend unseren Erfahrungen in Tierversuchen ist somit auch hier die Beständigkeit des vitaminähnlichen Stoffes in der Zelle bedeutend größer. Zur Entscheidung, ob in den vorliegenden Versuchen tatsächlich nur Fermente den V-Stoff schädigen, müssen Untersuchungen mit erhitzten Stückchen angestellt werden.

Da das Vitamin C bei der Keimung sich vermehren soll (Fürst), haben wir auch entsprechende Bakterienversuche angesetzt. Sie konnten nicht in der nötigen Zahl durchgeführt werden, da die Ausfälle infolge Verunreinigung zu groß waren. Es ist auch denkbar, daß die Anhäufung der akzessorischen Stoffe durch die nachweisbare Vermehrung der Fermente paralysiert wird.

Die Ergänzung dieser Versuche mit Zitronensaft und Kokosmilch wird hier am ehesten Klarheit bringen. Insbesondere sind die für die

Erkennung der Vitaminart wertvollen Adsorptionsversuche nur mit derartigen Flüssigkeiten durchführbar. Die Versuche von Knorr mit Blutnährmitteln sprechen für Vitamin C, das im allgemeinen auch durch Knochenkohle wenig adsorbiert wird. Auf Levinthal-Agar, der mit Knochenkohle geschüttelt wurde, wuchsen so nur die allein auf den V-Faktor angewiesenen hämolytischen Influenzabazillen.

Andererseits wurde schon berichtet, daß ein den V-Stoff ausschaltendes Serum auch in pflanzlichen Nährmitteln[1]) wirkt. Es erhebt sich daraus die Frage, ob es sich um einen fermentativen Vorgang oder um reine Adsorptionserscheinungen handelt. Die Gleichmäßigkeit dieser Versuche kann dadurch gestört werden, daß die Stoffe mit akzessorischer Wirkung an verschiedene Körper gekuppelt sind, die sich gegen Adsorption und Serumwirkung verschieden verhalten.

Schon Davis hat darauf hingewiesen, daß die für das Wachstum der Influenzabazillen nötigen Stoffe in verschiedenen Pflanzen vorhanden sind.

Thjötta und Avery fanden auch die benzidinnegativen Bananen geeignet, obwohl die den X-Faktor anzeigende Benzidinreaktion dem Influenzawachstum parallel gehen soll (Olsen). Wie schwierig der Schluß von negativer Benzidinreaktion auf das Fehlen von Peroxydasen werden kann, haben wir schon in der Mitteilung „Ueber den Nachweis der Blutperoxydasen in bakteriologischen Nährmitteln" zu zeigen versucht. Auch bei den Pflanzen ist es ähnlich. Nach Griebel enthalten die Bananen je nach ihrem Reifungszustand gelösten oder ungelösten Gerbstoff. Gerbstoffe sollen nun schon in Spuren die Peroxydbildung verhindern.

Wir konnten zeigen, daß auch mit anderem Pflanzengewebe, entsprechend der Annahme der amerikanischen Autoren, gleichgültig, ob benzidinpositiv oder -negativ, Wachstum zu erzielen ist.

Histologische Untersuchungen gaben keinen Aufschluß über die Topographie der Keime in den Pflanzenstückchen. Es dürfte so das Hineinwachsen der Keime in die Zellen kaum eine Rolle spielen. Möglicherweise wirken aber die Stoffe, die an den Schnittflächen der Gefäßbündel frei werden, in erster Linie (Reizstoffe Haberlandts?). Die in die umgebende Flüssigkeit diffundierten Stoffe genügen sicher nicht, um ein dauerndes Wachstum zu unterhalten, wohl deshalb nicht, weil die Stoffe außerhalb der Zellen nicht stabil sind.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen erschien die Arbeit von Kollath. Zunächst konnte K. in Ringer- oder Kochsalzlösung nach Zusatz von Kartoffelstückchen kein Wachstum der Influenzabazillen erhalten. Versuche mit Ringerlösung haben wir nicht angestellt. Dagegen haben wir von der Tyrodelösung, ohne das Wachstum zu schädigen, schließlich alles weglassen können bis auf Kochsalz. Da Kollath schreibt, „die geringe Trübung konnte von dem eingebrachten Material herrühren", müssen wir annehmen, daß K. die Flüssigkeit

---

1) Z. B. 1,0 ccm aktives Hammelserum gemischt mit 1 ccm mit Sodalösung 1 : 1 bis zum Lackmusblaupunkt alk. Zitronensaft. Die Mischungen werden nach der angegebenen Zeit inaktiviert und zu je 20,0 $^1/_2$ Std. bei 120° im Autoklaven gehaltenen 5proz. Blutagar bei 45° gegeben:

0	Std.	37°	Wachstum	= +	Blutagar allein Wachstum = —
$^1/_2$	„	„	„	= +	„ u. 1,0 alk. Zitr. Wachstum = ++
1	„	„	„	= ±	„ „ 1,0 akt. Serum „ = —
2	„	„	„	= ±	(Auszug aus Versuch vom 3. 10. 24.)
4	„	„	„	= —	

nicht ausgesät hat. Dies ist aber unbedingt nötig. Auch darf natürlich niemals so viel Material eingebracht werden, daß es auch nur eine Spur Trübung erzeugt, sonst sind die Ergebnisse, worauf Knorr schon gelegentlich der Besprechung der Versuche von Tinti hingewiesen hat, nicht stichhaltig. Die Untersuchung des V-Körpers, getrennt vom X-Körper, ist nach unserer Ansicht schon durch den Ammenversuch gegeben und in dieser Richtung besprochen und untersucht worden (vgl. Dtsch. med. Woch. 1925, H. 2). Die Gewinnung von V aus Kartoffeln ohne X, die Kollath gelungen ist, bedeutet für die Frage nach der Natur dieses Stoffes einen wesentlichen Fortschritt. Was die Serumwirkung auf Zellen betrifft, so wurde stets berichtet, daß die Wirkung nur bei aufgelöstem Blut festzustellen ist, und sich demgemäß der Hinweis in der Dtsch. med. Woch. auch nur auf Säfte der Vegetabilien erstreckt.

Die übrigen Befunde von Kollath stehen im Einklang mit den hier und in früheren Arbeiten mitgeteilten Ergebnissen.

Zusammenfassung.

1) Es gelingt, dauernd Influenza- (Koch-Weeks-) Bazillen in Tyrodelösung nach Zusatz von Kartoffelstückchen zu züchten. Der Nachweis wurde an über 100 durch $1^1/_4$ Jahre fortgeführte Zuchten von Koch-Weeks- und Influenzabazillen erbracht. — 2) Auch in gewöhnlicher Kochsalzlösung wuchsen diese hämophilen Keime nach Zusatz von frischen Kartoffelstückchen. — 3) Für alle derartigen Versuche war das Alter der Kartoffeln, die Dauer der Erhitzung, Trocknung und feuchten Aufbewahrung so ausschlaggebend, daß bei der Technik der Gewinnung der Kartoffelstückchen aus dem Inneren an die wachstumsfördernde Wirkung eines Vitamin C-ähnlichen Stoffes gedacht werden mußte. Auch die Unbeständigkeit des Stoffes außerhalb der Zellen sprach dafür. — 4) Es gelingt auch, mit benzidinnegativen Früchten Wachstum der Influenza- (Koch-Weeks-) Bazillen zu erhalten, da die Benzidinprobe bei der gleichen Frucht zu verschiedenen Zeiten schwanken kann. — 5) Das Wachstum der Influenza (Koch-Weeks-) Bazillen konnte in den Pflanzenstückchen nicht nachgewiesen werden. — 6) Auch in diesen sich nunmehr über 2 Jahre erstreckenden Versuchen verhielten sich die aus klinisch[1]) sicheren Koch-Weeks-Fällen (Epidemiefälle, nicht Einzelfälle!) gezüchteten Koch-Weeks-Bazillen wie echte Influenzabazillen.

Wir betrachten dies als weiteren Beweis für die Gleichheit des Influenza- mit dem Koch-Weeks-Bazillus und ziehen daraus wiederum den Schluß, daß das Influenzaproblem auf diesem Wege im Sinne Pfeiffers geklärt werden kann.

Dem Hilfsausschuß der Rockefeller-Stiftung danken wir für die Unterstützung zur Ausführung dieser Arbeit.

(Schriftennachweis folgt später[2]).

1) Die Kranken wurden durchweg in der Univ.-Augenklinik von Herrn Prof. Dr. B. Fleischer und Herrn Privatdozent Dr. R. Wißmann untersucht.

2) „Die Entwicklung des Vitamingedankens in der Bakteriologie", Weichardts Erg. Bd. 7.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über Blutschmarotzer bei einheimischem Vogelwild.

[Aus dem Protozoenlaboratorium des Reichsgesundheitsamts (Leiter: Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Schuberg).]

Von Dr. **W. Böing** (Berlin-Lichterfelde).

Mit 2 Tafeln.

Ende August 1913, in einem Monat, der sich durch trockene Wärme auszeichnete, stöberte bei Niesky in der Ober-Lausitz mein Jagdhund aus einer kleinen Mulde ein einzelnes Rebhuhn auf, das ängstlich flatternd vor ihm davonlief und dadurch zunächst den Eindruck erweckte, als ob es den Hund von seinen Küken weglocken wollte. Da ich bei genauerem Zusehen erkannte, daß das Tier nicht imstande war, zu steigen, ließ ich es vom Hunde apportieren, der mir daraufhin das Rebhuhn lebend brachte. Es war ein älterer Hahn, der bei der Besichtigung sofort erkennen ließ, daß es ihm infolge seines schwerkranken Zustandes nicht möglich war, von seinen Flügeln Gebrauch zu machen. Das rechte Auge war völlig vereitert und zeigte nach Entfernung des Eiters eine Höhlung ohne Augapfel; am linken Auge waren die Lidränder durch Eiter verklebt, die Conjunctiven in starker Entzündung, Cornea und Linse aber noch nicht angegriffen, sondern spiegelnd und durchsichtig. Dem Anscheine nach vermochte das Tier noch mit diesem Auge zu sehen. Das Gefieder war rauh, nicht anliegend; an der Brust und zwischen den Flügelansätzen zeigten sich Kahlstellen, die eine starke Abmagerung des Tieres erkennen ließen. Der Brustknochen stand weit vor; rechts und links waren durch den fast völligen Schwund der Brustmuskulatur tiefe Höhlungen entstanden.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des lebend frischen Blutes zeigten sich in ihm Parasiten von Vogelmalaria, Trypanosomen und Leucocytozoen. Das Blut war auffallend hellrot, sonst ohne Besonderheit.

Die Sektion des Rebhuhnes ergab eine Vergrößerung der Leber und der Milz; beide waren hell verfärbt und von weichlicher Beschaffenheit. Die Lungen waren normal. Muskulatur an Brust und Ständern war kaum noch vorhanden. Dabei zeigten sich Magen und Darm voller Aesung. Die Federn saßen locker in der Haut und ließen sich durch Zupfen leicht ablösen.

Vom frischen Blut, von der Lunge, Leber, Milz und dem Knochenmark wurden zwecks weiterer Untersuchung Trockenausstriche gemacht. Zur Anfertigung von feucht fixierten Ausstrichen und zum Einbetten von Organen standen mir leider die Materialien bei dieser Gelegenheit nicht zur Verfügung.

Dieser Befund, auf den ich noch zurückkommen werde, veranlaßte mich, dem im eigenen Jagdrevier auftretenden Vogelwild genauere Aufmerksamkeit zuzuwenden und jedes erlegte Tier zu untersuchen. Die Blutausstriche wurden nunmehr jedesmal unmittelbar nach dem Schusse angefertigt, wobei das Wild meist noch mehr oder weniger Spuren des Lebens zeigte.

Die Angaben über Blutparasiten bei in Deutschland einheimischen Vögeln sind bis jetzt in der Literatur recht zerstreut, und auch aus den Zusammenstellungen in den bekannten Handbüchern, in denen speziell parasitische Protozoen bearbeitet sind, wie bei Doflein, Prowazek, Hartmann-Schilling, Mense, ist nur schwer eine Uebersicht über die einzelnen Formen der Vogelblut-Protozoen und über ihr Vorkommen bei den einzelnen Vogelarten, besonders bei den wildlebenden, zu gewinnen. In dem verdienstvollen Buche von Olt und Ströse über „Wildkrankheiten“[1]) ist überhaupt nur das Vorkommen von Haemoproteus beim Auerhahn angeführt. Besondere, die wildlebenden Vögel betreffende Arbeiten, wie sie beispielsweise für Italien von Franchini[2]) veröffentlicht wurden, scheinen für Deutschland überhaupt nicht vorzuliegen.

Nach den Ergebnissen meiner Untersuchungen halte ich es für wahrscheinlich, daß eine eingehendere Untersuchung einer größeren Anzahl von Vogelarten die Zahl der in Deutschland vorkommenden Arten von Blutparasiten wohl nicht unerheblich erhöhen dürfte.

Ein Punkt kann indessen nicht unerwähnt bleiben, vor allem auch deshalb, weil er wahrscheinlich die Erklärung für die Spärlichkeit der bisherigen Feststellungen gibt: das sind die Umstände, welche solche Feststellungen erschweren. Diese erschwerenden Umstände sind der Jagdschutz und die Beschränkung der Ausübung der Jagd einerseits und andererseits der Vogelschutz. An diesen segensreichen Einrichtungen soll — es dürfte kaum nötig sein, dies besonders zu betonen — selbstverständlich nicht gerüttelt werden. Für Feststellungen über das Vorkommen von Vogelparasiten haben sie aber doch die Bedeutung, daß im allgemeinen fast nur Untersuchern, welche die Berechtigung zur Ausübung der Jagd besitzen, überhaupt die Möglichkeit zur Anstellung solcher Beobachtungen gegeben ist; außerdem erschwert eine strenge Bindung an die Vorschriften des Vogelschutzes auch ihnen die Untersuchung von Fragen, deren Klärung doch gerade im Interesse des Vogelschutzes, des Jagdschutzes und der Erhaltung unseres Wildbestandes gelegen ist. Indessen dürfte zu hoffen sein, daß sich in Jägerkreisen Verständnis für diese Fragen wird erwecken lassen, und daß hier und dort sich Jäger bereit finden werden, die Untersuchung dieser Fragen durch Lieferung von Material zu unterstützen. Diese Untersuchungen sollten aber nicht beschränkt bleiben auf Reviere mit kranken Beständen, sondern sie müßten auch auf die Bezirke ausgedehnt werden, deren Bestand anscheinend gesund ist.

Ich gebe zunächst eine Uebersicht über die Infektion der untersuchten Vogelarten, an die sich dann eine Beschreibung der einzelnen Parasitenformen anschließen wird; die Beobachtungen erstrecken sich vorwiegend auf die Jahre 1913—1917; nur für das Rebhuhn konnte noch ein späterer Befund, aus dem Jahre 1921, hinzugefügt werden.

Für die Darstellung meiner Untersuchungsergebnisse besteht eine nicht geringe Schwierigkeit, die sich übrigens auch in anderen Arbeiten bemerkbar macht, in den Nomenklaturfragen. Vielfach sind die

1) Olt, A., u. Ströse, A., Die Wildkrankheiten und ihre Bekämpfung. Neudamm 1914.

2) Franchini, G., In: Bull. Soc. Path. exot. No. 2. 1923, und in: Ann. Inst. Pasteur T. 38. 1924. No. 6.

einzelnen Parasitenarten nämlich als solche nicht benannt und werden einfach nur als Haemoproteus, Leucocytozoon, Trypanosoma usw. angeführt; und soweit Speziesnamen verwendet werden, ist es meist schwer oder ganz unmöglich, die einzelnen Spezies einigermaßen deutlich voneinander abzugrenzen. Da somit die Systematik der sämtlichen im Blute der Vögel lebenden Protozoen-Arten einer gründlichen Durcharbeitung bedürftig erscheint, habe ich darauf verzichtet, die einzelnen von mir gefundenen Formen in bestimmte Arten einzureihen oder als neue Arten zu beschreiben. Eine solche Durcharbeitung der Vogelblut-Protozoen in systematischer Hinsicht vorzunehmen, habe ich selbst aus dem Grunde unterlassen, weil diese wohl auf breiterer Grundlage erfolgen sollte, als ich sie selbst an Hand des mir bisher vorliegenden Materials auszuführen imstande wäre.

I. Verteilung der beobachteten Parasiten auf die untersuchten Arten von Wirtstieren[1]).

1. Rebhuhn (Perdix perdix (L.).

Bei weitem am stärksten war bei dem zuerst untersuchten Rebhuhn, dessen Sektionsbefund schon oben mitgeteilt wurde, die Infektion mit Vogelmalaria; jedes zweite bis dritte Blutkörperchen wies einen Malariaparasiten auf. Weniger stark war die Infektion mit Leucocytozoon; auch war diese in den einzelnen Organen verschieden stark. Bei Zeiß-Objektiv Imm. 2 mm zeigte sich im Blutausstrich in jedem 4.—5. Gesichtsfeld ein Parasit, in den Ausstrichen von Leber und Milz in jedem Gesichtsfeld etwa einer, im Knochenmark 3—4 und in der Lunge 8—10 Parasiten. Trypanosomen wurden im ganzen 10 gefunden; von ihnen aber wiederum 3 Formen, die sich wesentlich voneinander unterschieden.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen kamen von Rebhühnern im ganzen 186 Tiere zur Beobachtung. Von diesen waren infiziert: mit Malaria und Leucocytozoon 100 Proz., mit Haemoproteus 40 Proz. und mit Trypanosomen 60 Proz. Seit August 1918 hat die Häufigkeit der Infektion stark abgenommen.

Es lag nahe, ein in meinem Jagdgebiet seit dem Jahre 1911 beobachtetes starkes Zurückgehen des Bestandes an Rebhuhnwild zu der geschilderten Infektion in Beziehung zu bringen. Während in früheren Jahren mehrere Hundert Stück Hühner geschossen wurden, verringerten sich die Ketten 1912 bis auf etwa 15; 1913 habe ich nur etwa 10 Ketten gefunden und 1914 nur noch 8 Ketten. Während des Krieges hat sich der Bestand ohne Aussetzung fremden Blutes langsam wieder gehoben, so daß in dem Revier von annähernd 3500 Morgen im Jahre 1920 19 Ketten gezählt wurden.

Die Infektion der Rebhühner mit Vogelmalaria und Leucocytozoon und ebenso mit Filaria war in Deutschland in den letzten Jahren anscheinend weit verbreitet. In den Jahren 1913 und 1914 habe ich aus verschiedenen Gegenden mir Rebhühner lebend schicken lassen, so aus Ost- und Westpreußen, aus Pommern und Mecklenburg, Westfalen und dem Rheinland (Düsseldorf, Köln, Frankfurt a. M.), aus Bayern, Thüringen und Böhmen. Stets war die Mehrzahl der Tiere infiziert. Die gleiche Infektion fand ich 1913/14 bei selbstgeschossenen Rebhühnern in der Nähe von Berlin (Domäne Dahlem), in der Provinz

1) Vgl. hierzu auch die Tabelle auf S. 318.

Posen, in Schlesien (bei Görlitz), und während des Krieges in Lothringen bei Landonvillers und bei Gaudach.

Bei Nachfrage wurde mir schon vielfach vor dem Kriege von aufmerksamen Jägern ein Zurückgehen des Rebhuhnbestandes bestätigt.

Im Sommer 1921 erhielt ich von Herrn Geheimrat Ströse, Leiter des Instituts für Jagdkunde in Zehlendorf, ein totes Rebhuhn, altes Männchen, das in einem Jagdbezirk in Pommern tot aufgefunden war. Mit Sicherheit ließ sich noch eine sehr starke Vogelmalariainfektion nachweisen. Auch eine Infektion mit Leucocytozoon war wahrscheinlich, jedoch bei dem bereits vorgeschrittenen Zerfall des Blutes nicht mehr ganz einwandfrei festzustellen.

2. Birkhuhn (Lyurus tetrix L.)

Im Gegensatz zu der seit 1914 wieder fortschreitenden allmählichen Zunahme der Rebhühner hat sich in dem gleichen Jagdbezirk eine Abnahme des Birkwildes bemerkbar gemacht.

Die seit 1913 durchgeführte Blutuntersuchung hat bei dieser Art eine zunehmende Infektion an Vogelmalaria, Trypanosomen, Leucocytozoon, Haemoproteus und Filaria gezeigt, so daß auch hier nicht von der Hand zu weisen ist, daß zwischen der Infektion und dem Zurückgehen des Wildbestandes ein Zusammenhang besteht.

Das Birkwild, das ehedem Standwild war und von dem früher fast in jedem Jahre 12—15 Tiere ohne Schädigung des Bestandes abgeschossen werden konnten, ist jetzt bis auf wenige Tiere ausgestorben. Für die Auffassung, daß das Zurückgehen des Bestandes auf die genannten Infektionen zurückzuführen ist, spricht auch das häufigere Auffinden verendeter Tiere, die keinerlei äußere Verletzungen zeigten, in deren Blut sich aber stets eine oder mehrere der erwähnten Blutinfektionen nachweisen ließen.

Im Jahre 1913 wurden 4 Hähne und 2 Hennen geschossen, die alle von jeder Infektion frei waren. Im Frühjahr 1914 waren von 5 erlegten Hähnen 3 mit Vogelmalaria, Leucocytozoon und Trypanosomen, einer mit Filaria und Haemoproteus infiziert. Im Frühjahr 1915 wurden von 3 Hähnen und 3 Hennen 3 Tiere (ohne Angabe des Geschlechts) untersucht; davon waren alle 3 mit Vogelmalaria, Leucocytozoon und Trypanosomen infiziert. In gleicher Weise war ein im Frühjahr 1918 von mir geschossener Hahn von den genannten 3 Parasitenarten befallen. 1919 und 1920 wurde aus Schonungsgründen kein Tier mehr erlegt. Ein im Frühjahr 1921 geschossener Hahn zeigte wiederum eine Infektion mit Vogelmalaria, Leucocytozoon und Trypanosomen. Der bis auf 5 Tiere zurückgegangene Bestand wird zurzeit geschont.

3. Auerhuhn (Tetrao urogallus L.).

In den Jahren 1913 und 1914 hatte ich Gelegenheit, 3 Tiere zu untersuchen. Bei einem fand ich eine Haemoproteus-Infektion, bei dem zweiten Leucocytozoon und Haemoproteus; das dritte Tier war von Parasiten frei.

4. Fasan (Phasianus colchicus L.).

Auch bei Fasanen war, wie beim Birkwild, seit 1914 eine Abnahme des Bestandes bemerkbar. Das verstärkte Wildern war nach

meiner Beobachtung gerade bei diesen Tierarten nicht verantwortlich zu machen. Dies mag bei Rehen, Hasen, Kaninchen usw. zutreffen, die unter den Schußwaffen und Schlingen der Wilderer während der Kriegs- und Nachkriegszeit stark gelitten haben. Das starke Abnehmen der Fasanen, das sich über ganz Deutschland erstreckt, muß aber doch wohl andere Ursachen haben, die einmal in der durch den Krieg bedingten Vernachlässigung der Fasanerien zu suchen sind, zum andern aber durch ein seuchenhaftes Absterben dieses Wildes bedingt sein dürften. So sind die Fasanen in meinem Jagdbezirk trotz der seit dem Jahre 1919 bestehenden völligen Schonung bis auf wenige Tiere ausgestorben.

Im ganzen wurden [illegible]0 Fasanen untersucht. Von diesen waren infiziert: 50 Proz. mit Vogelmalaria, 40 Proz. mit Haemoproteus, 15 Proz. mit Leucocytozoon, 15 Proz. mit Trypanosomen, und 2 Proz. mit Filaria.

Das Auftreten der Infektion war 1913—15 schwächer, nahm dann aber zu; der Wildbestand wurde geringer und wird seit 2 Jahren geschont. Seit 1918 sind Fasanen nur von mir persönlich geschossen worden; jedes Tier wurde untersucht und war ohne Ausnahme mit Vogelmalaria, Leucocytozoon und Trypanosomen infiziert. Dazu kam ab und zu Filaria.

5. Tauben.

Von der Ringeltaube (Columba palumbus L.) wurden 1913 und 1914 68 Tiere erlegt. Davon waren 20 Tiere mit Vogelmalaria, 8 mit Haemoproteus infiziert; andere Infektionen wurden nicht gefunden. In den Jahren 1915—17 wurden wilde Tauben nicht geschossen. Im Sommer 1918 waren von 42 Tauben 26 mit Vogelmalaria, Leucocytozoon und Trypanosomen, der Rest mit Haemoproteus infiziert. Außerdem wurde bei 3 Tauben Filaria gefunden. Es war also kein Tier ohne Infektion. Im Sommer 1919 und 1920 war der Bestand der wilden Tauben auffallend gering. Nach der Beobachtung meines Försters trat in beiden Sommern während der Sommermonate auch keine auffallende Vermehrung durch die Brut ein. Auch ich habe die großen Flüge der früheren Jahre nicht mehr beobachten können.

Im Sommer 1920 schoß ich 8 Ringeltauben; davon hatten 3 Vogelmalaria, 3 Vogelmalaria, Leucocytozoon und Trypanosomen, 2 Haemoproteus. 1921 war von 10 Tieren jedes mit Vogelmalaria und Leucocytozoon infiziert, außerdem 2 noch mit Trypanosomen und eins mit Filaria. Im ganzen waren befallen von insgesamt 128 Tieren: 62 (48,4 Proz.) mit Vogelmalaria, 39 (30,4 Proz.) mit Leucocytozoon, 31 (24,2 Proz.) mit Trypanosomen, 26 (20,3 Proz.) mit Haemoproteus, 4 (3,1 Proz.) mit Filarien.

Von Turteltauben (Turtur turtur L.) habe ich 3 Tiere geschossen, von denen eins mit Haemoproteus infiziert war. Der Bestand an diesen Tieren im Revier war stets gering und hat sich seit Jahren kaum geändert.

Seit 1913 habe ich auch auf dem Gutsbezirk gehaltene Feldtauben untersucht (Columba livia L. var. domestica) und bei ihnen keinerlei Infektion gefunden.

6. Laufvögel (Cursores), Reiher und Störche.

Von 5 Schnepfen (Scolopax rusticola L.) hatte eine Haemoproteus; von 3 untersuchten Strandläufern (Tringa canutus L.) wurden bei 2 Tieren Filarien gefunden.

Bei 10 geschossenen erwachsenen Kiebitzen (Vanellus vanellus L.) war keinerlei Infektion nachzuweisen; zwei aus dem Nest genommene, noch nicht flügge Junge dieser Art dagegen zeigten im Blute Haemoproteus und Leucocytozoon.

Unter 8 Rohrdommeln (Botaurus stellaris L.) enthielten zwei Haemoproteus.

Das Blut von 6 Nachtreihern (Ardea nycticorax L.) und ebenso das eines auf dem Gute erbrüteten, bei der Untersuchung 2 Monate alten Storches (Ciconia ciconia L.) waren von Parasiten frei.

7. Raubvögel.

Ein zur Krähenjagd in Gefangenschaft gehaltener sibirischer Uhu (Bubo bubo sibiricus Lcht.) zeigte in den Sommermonaten, und von diesen wieder am stärksten im August, eine Infektion mit Leucocytozoon und Trypanosomen. Im Winter verschwanden die Trypanosomen aus dem Blute, um im Mai sich wieder einzufinden. In heißen, feuchten Sommermonaten war die Infektion am stärksten. Daß das Tier während der Zeit seiner Gefangenschaft gesundheitlich darunter gelitten hätte, habe ich nicht beobachten können. Mit Ausbruch des Krieges 1914 wurde er verkauft, so daß weitere Untersuchungen nicht angestellt werden konnten.

Eine Waldohreule (Asio otus L.), geschossen im Juli 1918, war mit Haemoproteus, Leucocytozoon, Trypanosomen und Filaria infiziert.

Mit den gleichen Blutschmarotzern waren Gabelweihe (Milvus milvus L.), kleine Rohrweihe (Circus aeruginosus L.) und Turmfalke (Cerchneis tinnunculus L.) zum Teil in sehr hohem Prozentsatze behaftet.

8. Elster und andere Singvögel.

Anfang Juni 1914 fand ich im hohen Baumbestand des Gutsparkes in der Spitze eines Baumes das Nest einer Elster (Pica pica L.), in dem sich noch nicht flügge Junge befanden. Da das Nest durch Klettern nicht zu erreichen war, wurde der Ast kurz unterhalb des Nestes mit einem Halbmantelgeschoß durchschossen und so das Nest nebst drei Jungen gewonnen.

Im Nest und unter dem Flaum der jungen Elstern fanden sich reichlich Lausfliegen (Ornithomyia avicularia), die völlig grün gefärbt waren; Kopf, Thorax und Beine zeichneten sich dem Körper gegenüber durch hohen Glanz aus. Die Flügel waren so weit entwickelt, daß die Lausfliegen 1—$1^1/_2$ m weite Flugsprünge ausführen konnten. Die Tiere waren außerordentlich schnell und gewandt und ließen sich nur schwer fangen. Die gleiche Lausfliege habe ich im Sommer 1920 bei der Elster wiedergefunden. Die bei sonstigen Vögeln von mir gefundenen Pupiparen waren hellbraun und entsprachen der Beschreibung, die Grünberg in seinem Werk „Die blutsaugenden Dipteren" von ihnen gibt.

Vom frischen Blut der lebenden jungen Elstern und der noch schwach lebenden Mutter wurden unter allen Vorsichtsmaßregeln trockene

und feucht fixierte Ausstrichpräparate gemacht und dann erst die Elstern zwecks Untersuchung der inneren Organe getötet; ebenso wurden von den Lausfliegen Magen- und Darmausstriche hergestellt. Ich lege Wert auf die Feststellung, daß die Blutausstriche von den lebenden Tieren, und daß ebenso die Organausstriche unmittelbar nach dem Töten der Elstern angefertigt wurden, und zwar wegen der Befunde an Leucocytozoon, die ich an diesen Tieren erheben konnte (s. S. 321).

Alle erlegten Elstern — 14 Tiere — waren mit Leucocytozoon infiziert und enthielten stets auch einzelne Trypanosomen.

Vogelmalaria, Trypanosomen, Leucocytozoon und Haemoproteus fanden sich, zum Teil in sehr reichlichen Mengen, auch beim Holzhäher (Garrulus glandarius L.), bei der Nachtschwalbe oder Ziegenmelker (Caprimulgus europaeus L.), dem Würger (Lanius excubitor L.), dem Neuntöter (Lanius collurio L.) und dem Kernbeißer (Coccothraustes coccothraustes L.).

Die Blutuntersuchung der Schwalben (Hirundo rustica L.) auf dem Gutshofe war stets negativ.

9. Leistenschnäbler (Lamellirostres).

Unter Enten (Anatidae) habe ich weder bei der Stockente (Anas boschas L.) noch bei der Knäkente (Anas querquedula L.) Blutparasiten finden können, obwohl davon im ganzen etwa 50 Tiere untersucht wurden. Auch die Untersuchungen bei den Tauchenten (Fuligulidae) waren in allen Fällen negativ. Von wilden

Uebersichtstabelle.

Tierart	Anzahl	Vogelmalaria	Leucocytozoon	Trypanosomen	Haemoproteus	Filaria
Perdix perdix	186	+	+	+	+	+
Lyurus tetrix	16	+	+	+	+	+
Tetrao urogallus	3	.	+	.	+	.
Phasianus colchicus	120	+	+	+	+	+
Columba palumbus	128	+	+	+	+	+
Turtur turtur	3	.	.	.	+	.
Scolopax rusticola	5	.	.	.	+	.
Vanellus vanellus	12	.	+	.	+	.
Botaurus stellaris	8	.	.	.	+	.
Ardea nycticorax	6	.	.	.	.	.
Ciconia ciconia	1	.	.	.	.	.
Bubo bubo sibiricus	1	.	+	+	.	.
Asio otus	1	.	+	+	+	+
Milvus milvus	2	.	+	+	+	+
Circus aeruginosus	3	.	+	+	+	+
Cerchneis tinnunculus	2	.	+	+	+	+
Pica pica	14	.	+	+	.	.
Garrulus glandarius	x[1])	+	+	+	+	.
Caprimulgus europaeus	x	+	+	+	+	.
Lanius collurio	x	+	+	+	+	.
Lanius excubitor	x	+	+	+	+	.
Coccothraustes coccothraustes	x	+	+	+	+	.
Hirundo rustica	x	.	.	.	.	.
Anas boschas	ca. 50	.	.	.	.	.
Anas querquedula	x	.	.	.	.	.
Fuligulidae	x	.	.	.	.	.
Anser ferus	ca. 200	.	.	.	.	.
Fledermäuse	2	.	+	+	.	.

1) Die Anzahl der untersuchten Tiere war nicht notiert worden.

Gänsen (Anser ferus Naum.) habe ich durch einen glücklichen Zufall im Winter 1917/18 über 200 Tiere im Warthebruch zu untersuchen Gelegenheit gehabt; in keinem Falle konnte ich eine Infektion feststellen.

10. Fledermäuse (Chiroptera).

2 Fledermäuse, deren Artzugehörigkeit leider nicht festgestellt werden konnte, wiesen Trypanosomen und Leucocytozoon auf.

II. Beschreibung der einzelnen Parasitenarten.

1. Trypanosomen.

Trypanosomen bei Vögeln sind schon in sehr zahlreichen Fällen beobachtet worden. Schon 1912 konnten Laveran und Mesnil[1]) auf Grund der in der Literatur vorhandenen Angaben über 100 Vogelarten verzeichnen, in denen Trypanosomen gefunden wurden. Gehört auch die bei weitem größte Mehrzahl dieser Vogelarten außereuropäischen Faunengebieten an, so sind doch auch eine ganze Reihe europäischer Vögel — 29 Arten — angeführt. Um so auffallender ist es daher, daß die Angaben über deutsche Vögel, und besonders über jagdbares Vogelwild, noch recht spärlich sind. In dem Buche von Olt und Ströse „Die Wildkrankheiten und ihre Bekämpfung", das eine so sorgfältige Zusammenstellung aller aus unseren heimischen Wildarten bekannten Parasiten gibt, ist beispielsweise nicht eine einzige Trypanosomenart aus Wildgeflügel aufgeführt. Wenn es vielleicht auch zutreffen mag, daß die Zahl der Blutparasiten auch bei Vögeln in wärmeren Ländern eine größere ist als in unseren Breiten, so ist doch die Tatsache, daß für Deutschland bisher nur so vereinzelte Beobachtungen vorliegen, wohl nur dem Mangel an ausreichenden Beobachtungen zuzuschreiben. In dem oben angeführten Verzeichnis von Laveran und Mesnil ist nur bei einer einzigen Art Deutschland (Helgoland) als Fundort genannt; für zwei andere Arten ist ganz Europa als Verbreitungsgebiet angegeben; das wären für Deutschland also höchstens 3 Arten. Für England allein sind 7 Arten namhaft gemacht, für Portugal dagegen 19 Spezies. Dieser Unterschied dürfte, wenn auch nicht ausschließlich, so doch wenigstens der Hauptsache nach nur darauf beruhen, daß in Portugal França den Vogelblutparasiten eingehende Aufmerksamkeit gewidmet hat, während in Deutschland systematische Untersuchungen in dieser Richtung anscheinend noch nicht vorliegen (vgl. oben S. 313). Dafür sprechen die Ergebnisse meiner Untersuchungen; denn, obwohl ich im ganzen nur etwa 26 deutsche Vogelarten[2]) untersucht habe, fand ich in 14 von diesen Trypanosomen.

Wenn auch eine genaue Umgrenzung der Vogel-Trypanosomen noch aussteht, so ist doch wohl nicht ausgeschlossen, daß manche von ihnen sich nur als Varietäten erweisen werden.

Die ersten Vogel-Trypanosomen wurden von Danilewsky im Blute von Syrnium aluco (L.) gefunden. Trypanosomen aus Sperlingsvögeln, die einander in ihrer Form sehr ähnlich sind, bezeichnet man heute als Trypanosoma avium Danilewsky. Weitere Befunde wurden erhoben von Laveran und Mesnil, von Schau-

1) Laveran, A., et Mesnil, F., Trypanosomes et Trypanosomiases. 2. Ed. Paris 1912. p. 819.

2) Der Jagduhu ist hierbei nicht mitgerechnet.

dinn, der die von ihm im Blute des Steinkauzes Glaucidium noctua gefundene Art für ein Entwicklungsstadium von Haemoproteus noctuae hielt, ferner von Novy und Mc Neal, von Dutton und Todd, von Ziemann, Hanna, von Calmette, Mathis und Leger und anderen. Die Trypanosomen sind gefunden worden bei Vögeln in fast allen Erdteilen, so bei Sperlingen, Lerchen, Tauben, Schwalben, Eulen, Krähen usw. Nicht beschrieben worden sind sie aber bisher als Parasiten von Rebhühnern, wie ja überhaupt in der Literatur Blutuntersuchungen des deutschen jagdbaren Vogelwildes nur äußerst spärlich zu finden sind.

Ich selbst fand Trypanosomen bei folgenden Vögeln: Rebhuhn, Birkhuhn, Fasan, Ringeltaube, Uhu, Waldohreule, Gabelweihe, Rohrweihe, Turmfalke, Elster, Holzhäher, Nachtschwalbe, Würger, Neuntöter, Kernbeißer, außerdem bei Fledermäusen.

In dem Blute der untersuchten Vögel kamen drei verschiedene Formen von Trypanosomen vor. Sie sind wiedergegeben in den Abbildungen 54—60.

Die erste Form, die im Rebhuhn beobachtet wurde (Fig. 54 u. 55) stimmt am meisten mit der bekannten Form des Trypanosoma avium Danilewsky em. Laveran überein. Das zum Vergleich daneben gezeichnete rote Blutkörperchen läßt ihre außerordentliche Größe erkennen. Ihre Körperbewegungen sind lebhaft, ihr Fortrücken von der Stelle dabei langsam und träge. Die Pellicula zeigt meist eine sehr deutliche Längsstreifung. Das Plasma färbt sich nach Giemsa mehr oder weniger stark blau, die undulierende Membran ist gut ausgebildet, die beiden Enden sind scharf zugespitzt. Der Kern liegt in der Mitte, ist groß und zeigt bei der Färbung sich manchmal leuchtend rot mit grobem, körnigem Inhalt, ein ander Mal ganz blaß gefärbt mit feineren Körnchen als Inhalt; der Blepharoplast liegt in der Mitte zwischen Kern und Hinterende und häufig scheinbar in einer Vakuole. Die Geißel ist gut ausgebildet, aber sehr kurz. Die 2., ebenfalls im Rebhuhn gefundene Form der Trypanosomen ist kleiner als die vorige und zeigt zum Teil einen schlankeren Bau (Abb. 56 u. 57). Die undulierende Membran wird deutlich von einem vom Blepharoplasten ausgehenden Geißelfaden begrenzt; eine das Vorderende überragende Geißel habe ich in keinem Falle finden können. Der Kern ist kleiner, ebenfalls nicht kompakt. Auffallend ist die Zeichnung nach der Giemsaschen Färbung; das Protoplasma ist hell bläulich-rosa und übersät mit scharf leuchtenden roten Körnchen. Meist liegt der Blepharoplast in der Mitte zwischen dem Kern und dem Hinterende, nur selten mehr nach dem Hinterende zu.

Auf Grund meiner Untersuchungen habe ich den Eindruck gewonnen, als ob diese beiden Trypanosomenformen — die erste und die zweite Form — ein und derselben Art angehörten und sich nur durch ihr Geschlecht voneinander unterscheiden, ebenso wie die männlichen und weiblichen Formen der später zu beschreibenden Leucocytozoen. Ein endgültiges Urteil möchte ich aber darüber noch nicht abgeben. Erwähnt sei nur noch, daß ich bei jedem Vogel, der eine Leucocytozoon-Infektion hatte, bei längerer Durchmusterung der Präparate auch diese beiden Formen der Trypanosomen gefunden habe.

Von ihnen gänzlich abweichend ist die dritte Form, die nicht nur bei Rebhühnern, sondern auch bei Birkwild und bei Fasanen festgestellt wurde (Fig. 58, 59 und 60). Diese Form ist bedeutend kleiner,

wenig größer als ein rotes Blutkörperchen; ein Teil dieser Trypanosomen ist ganz schlank (Fig. 58), die anderen sind bei etwa gleicher Größe doppelt und über doppelt so breit. Die Geißel überragt das Vorderende bis um ein Drittel der Körperlänge. Der Kern liegt nicht in der Mitte, sondern mehr zum Vorderende hin. Das Protoplasma ist nach Giemsa-Färbung von feiner blauer Körnelung und zeigt sehr häufig Vakuolen.

2. Leucocytozoon.

Das Leucocytozoon ist ein im Vogelblut vorkommender bekannter Parasit, der bei Krähen, Elstern, verschiedenen Singvögeln, im schottischen Moorhuhn (Lagopus scoticus), im Steinkautz (Athene noctua), in Scopa giu, Syrnium aluco und anderen Raubvögeln, im Haushuhn bei Tonkin, bei verschiedenen Reiherarten, bei Tauben usw., gefunden worden ist.

Ein Vorkommen im Rebhuhn war bisher anscheinend nicht bekannt.

Es werden mehrere Arten unterschieden, so Leucocytozoon Danilewskyi, Leuc. Ziemanni, L. Lovati von Seligmann und Sambon, das L. Neavii von Balfour in Numida ptilorhynchus im Sudan, L. Caulleryi von Matthis und Léger. Außer den bereits genannten Autoren haben Schaudinn, Sakharoff, Laveran, Reichenow, Hartmann, França, Franchini Untersuchungen über Leucocytozoon angestellt. Hier sei nur erwähnt, daß Schaudinn der Ansicht war, daß die Leucocytozoen nur ein Entwicklungsstadium von Trypanosomen darstellen.

Bei meinen Untersuchungen fand ich eine Infektion mit Leucocytozoon beim Rebhuhn, Birkhuhn, Auerhuhn, Fasan, der Ringeltaube, dem Kiebitz, Uhu, der Waldohreule, Gabelweihe, Rohrweihe, dem Turmfalken, der Elster, dem Holzhäher, der Nachtschwalbe, dem Würger, Neuntöter, Kernbeißer und der Fledermaus.

Die für den Parasiten gewählte Bezeichnung „Leucocytozoon" erweckt die Vermutung, daß die Entwicklung des Parasiten im Leukozyten stattfinde. Dies ist mit ganz seltenen Ausnahmen aber nicht der Fall. Eine solche Ausnahme gibt die Abbildung 7 auf Tafel 1 wieder.

Die von mir anfänglich beim Rebhuhn gefundenen Leucocytozoen boten gegenüber den bereits früher meist beobachteten und bekannten Formen des Parasiten nichts Neues. Einen großen Unterschied hiervon zeigten dagegen die bei Elstern gefundenen Formen des Leucocytozoon. Diese waren nicht langoval, sondern kugelig. Ovale Parasitenformen kamen in dem von mir untersuchten Blut und in den Organen der Elstern auffallenderweise überhaupt nicht vor, auch nicht im lebend frisch untersuchten Material. Solche runde Formen sind nun schon seit langer Zeit bekannt. Doflein gibt in seinem Lehrbuch der Protozoenkunde, 4. Auflage, auf Seite 855 unter Figur 846c eine Abbildung eines kugeligen Leucocytozoon aus Hypsipetes amaurotis aus Japan nach Ogawa und setzt dazu die Bemerkung, daß die Zelle vielleicht nachträglich abgekugelt sei. Ob tatsächlich die länglichen Leucocytozoen sich im toten Blut und in den Organen mehr oder weniger lange Zeit nach dem Tode des Tieres in derartiger Weise abkugeln können, was an sich vielleicht nicht unmöglich sein dürfte, vermag ich nicht zu entscheiden.

Im Archiv für Protistenkunde, Bd. 3, findet sich eine Arbeit

von Berestneff über das Leucocytozoon Danielewskyi, in der der Autor auf S. 383 folgendes ausführt: „Bei der Krähe und bei der Elster zeigten beide Parasitenarten eine rundlich-ovale Form, spindelförmige Formen waren gar nicht zu sehen; der voluminöse Kern des Parasiten mit schwach färbbarem Protoplasma war von feingranulierter Struktur, bei den einen kompakt, bei den andern so sehr aufgelockert, daß die Körnchen, aus denen sie zusammengesetzt waren, deutlich zu unterscheiden waren. Bei der Elster war die Parasitenmenge in den inneren Organen ebenso unbedeutend wie im peripherischen Blut." Im Handbuch der Tropenkrankheiten, Bd. 3, 1906, geht Lühe auf diesen Befund von Berestneff ein und sagt in dem Abschnitt über Leucocytozoon: „Außer diesem Eulenparasiten sind aber noch andere Leucocytozoen beobachtet worden, und zwar sind speziell beim Raben, bei der Saatkrähe und bei der Elster von Sakharoff und Berestneff Leucocytozoen gefunden worden, welche wahrscheinlich ein und derselben Art angehören, von der jedoch bisher nur die Gametocyten bekannnt sind. Als Unterschied dieser Art gegenüber dem Leucocytozoon ziemanni läßt sich bisher, abgesehen von der Verschiedenheit der Wirte, fast nur anführen, daß die Ruheformen der Gametozyten anscheinend niemals die langgestreckte Spindelform besitzen, welche für Leucocytozoon ziemanni so charakteristisch ist, daß sie vielmehr eine rundlich-ovale Form haben. Weitere Aufklärung über diesen von mir bisher vergeblich gesuchten Krähenparasiten können nur genauere entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen bringen."

Die Befunde Berestneffs bei den Krähen- und Elstern-Leucocytozoen kann ich bestätigen. Die von mir im Blute der Elstern gefundenen Leucocytozoen hatten nämlich alle ohne Ausnahme eine Kugelform, wie es in den Abbildungen Fig. 19—27 und 29—40 ersichtlich ist. Die langovale Form kam bei den von mir untersuchten Elstern überhaupt nicht vor, weder im Blut noch in den Organen, auch nicht im lebend frisch untersuchten Blut. Ich habe bis jetzt 14 Elstern untersucht, die alle vom Rittergut Sproitz in der Ober-Lausitz stammen; sämtliche 14 Tiere waren mit diesem runden Leucocytozoon infiziert. Von den im Sommer 1921 untersuchten Elstern waren 2 so stark infiziert, daß bei der Zeiß-Immersion 2 mm etwa 30 Parasiten pro Gesichtsfeld im Blute keine Seltenheit waren; in den Organen, vor allem Lunge und Milz, waren sie noch häufiger. Bei jedem Tier wurden auch vereinzelte Trypanosomen gefunden.

Es sei gestattet, hier nochmals darauf hinzuweisen, daß ich bei aufmerksamem Durchmustern der Präparate fast in jedem Vogel, der mit Leucocytozoon infiziert war, auch Trypanosomen finden konnte. Dies war mir auffallend, da bekanntlich Schaudinn sich dahin ausgesprochen hat, daß die Leucocytozoen als die Geschlechtsformen der Trypanosomen anzusehen seien. Die Bedeutung dieses Schaudinnschen Befundes wurde dadurch noch wesentlich erhöht, daß er bei dem Studium der Entwicklung des Halteridium und Leucocytozoon des Steinkauzes zu seiner bekannten Auffassung des Wesens der Befruchtung gelangte. Seine Befunde haben eine allgemeine Bestätigung nicht finden können, und besonders Novy und seine Mitarbeiter äußerten ihre Ansicht dahin, Schaudinn habe sich durch Mischinfektionen täuschen lassen. Auch die Versuche von Mayer, der den Entwicklungsgang von Leucocytozoon in der Mücke zum Teil im

Sinne Schaudinns verfolgen zu können glaubte, sowie die Befunde von Prowazeks, der aus Leucocytozoon-haltigem Blutmaterial, das sich bei vorheriger genauer Durchsuchung als trypanosomenfrei erwiesen hatte, Flagellaten kultivieren konnte, wurden abgelehnt.

Im Jahre 1914 hat wiederum Moldovan in seiner Arbeit „Der Zeugungskreis des Leucocytozoon ziemanni (Laveran)" im Arch. f. Protistenkd. bemerkenswerte Kulturversuche veröffentlicht, die darauf hinweisen, daß Leucocytozoon und Trypanosoma zu einem Entwicklungskreis gehören. Ich möchte hier nicht näher auf diese Frage eingehen, sondern nur in Hinsicht auf ihre Strittigkeit hervorheben, daß ich bei allen Untersuchungen niemals Leucocytozoon gefunden habe, ohne daß die Wirtstiere nicht auch Trypanosomen beherbergt hätten.

Von einer Beschreibung der langovalen Form des Leucocytozoon glaube ich absehen zu können, da sie zur Genüge besprochen worden ist.

Das akute Stadium der Leucocytozoon-Infektion habe ich in Uebereinstimmung mit Moldovan im Juli und August gefunden; je länger der August schwül und heiß ist, um so länger hält die akute Infektion an, d. h. um so später im August kann man sie noch finden. Wie lange der asexuelle Zyklus im Blute währt, konnte ich nicht feststellen, da die im folgenden beschriebenen Formen während der beiden Monate Juli und August gehäuft durcheinander vorkamen. In der kühleren Jahreszeit fand sich nur die Kugelform, wie sie die Figuren 22, 30, 31 zeigen.

Figur 1, 2 und 3 stellen Formen aus dem Rebhuhn dar, die sich frei im Blute finden; ob sie mit dem Leucocytozoon in Verbindung zu setzen sind, möchte ich dahingestellt sein lassen; sie wurden jedenfalls wiederholt gefunden, und zwar nur im Blut, das eine Leucocytozoon-Infektion aufwies. Abbildung 4 zeigt ein Leucocytozoon im Anfangsstadium der Entwicklung im Blutkörperchen. Die befallenen Blutkörperchen sind in den weitaus meisten Fällen Erythroblasten, die sich von Erythrocyten beim Vogelblut häufig nur durch eine wenig geringere Größe, durch einen mehr runden Kern und die Kernstruktur unterscheiden lassen. Mehrfach habe ich diese jungen Formen auch in Erythrocyten gefunden, in denen eine Weiterentwicklung aber nicht stattzufinden scheint, ebenso in mehrkernigen Leukozyten (Fig. 7). Ein Blutkörperchen kann eine Doppelinfektion (Fig. 10), auch eine solche verschiedenen Geschlechts aufweisen.

Je mehr nun der junge Parasit heranwächst, eine um so stärkere Eindellung zeigt der Kern des Blutkörperchens an der dem Parasiten zugewandten Seite. Es entwickelt sich beim Kern genau die gleiche Erscheinung, wie bei den Chlamydozoen oder bei den Guarnerischen Körperchen; je stärker der Parasit heranwächst, um so größer wird die Eindellung im Kern, bis schließlich der Parasit von dem Kern mehr oder weniger weit umfaßt wird.

Wenn Moldovan der Ansicht ist, daß schon die jüngsten endozellulären Parasiten mit dem Kern der Wirtszelle in innige Beziehung treten, und wenn M. Mine den Verdacht hat, daß die Parasiten in dem Kern selbst zu schmarotzen scheinen, so scheint mir im Gegenteil das Verhältnis des Parasiten zum Kern der Wirtszelle ein feindliches zu sein; zunächst weicht der Kern aus, dann wird er vom wachsenden Parasiten zur Seite gedrängt, seiner ursprünglichen

Form völlig beraubt, er verliert jegliche Struktur, um endlich zu zerfallen.

Die Entwicklung des Parasiten bis zur Figur 10 ist beiden Leucocytozoon-Formen, sowohl der zum ovalen wie der zum runden Gametozyten sich entwickelnden Form, gemeinsam. Während aber nun bei der bisher bekannten Form das Leucocytozoon sich allmählich streckt und dadurch Kern und Protoplasma der Wirtszelle ebenfalls langoval ausgezogen wird (Fig. 11—18), bleibt das Leucocytozoon der Elster nach wie vor gleichmäßig rund; beim weiteren Wachstum wird auch die Wirtszelle völlig abgerundet, der Kern wird mehr und mehr eingehöhlt, bis er wie ein dünner Ueberzug den Parasiten fast ganz umschließt. Um Parasiten und Kern liegt dann das Protoplasma der Wirtszelle nur noch als feiner Saum (Fig. 29—35 und 19—24). In den in Fig. 37—39 dargestellten Stadien scheint sich der Parasit von der zerfallenden Wirtszelle abzulösen, um sich zum Schizonten auszubilden (Fig. 40—44). Figur 45a zeigt freie Schizonten unmittelbar nach dem Ausschlüpfen. Gefunden wurden sie in der Milz einer stark infizierten Elster im Sommer 1921.

Bei dem runden Leucocytozoon treten die unterschiedlichen Merkmale der männlichen und weiblichen Gametozyten in der gleichen Weise auf wie bei der langovalen Art. Die Färbung nach Giemsa läßt die charakteristische Beschaffenheit des Plasmas und der Kernstruktur der Gameten deutlich erkennen. Bei dem weiblichen Gametozyten färbt sich das reservestoffreie Protoplasma dunkelblau, der Kern ist klein. Bei dem männlichen Gametozyten ist das Protoplasma leicht gefärbt und nimmt manchmal einen schwachen rosaroten Ton an, die Kernsubstanz ist locker gefügt und kann sich fast über den ganzen Parasiten verteilen; schließlich wird der Kern fragmentiert und zerfällt chromidienartig. Oft läßt er eine karyosomartige Differenzierung erkennen und man findet im Bereiche des Kernes oder in seiner Nähe häufig ein blepharoplastähnliches Körnchen (Fig. 13, 14, 20, 29, 36). In der späteren Entwicklung treten im Protoplasma dunkelrot sich färbende Granulationen (Volutinkörnchen) auf, das Plasma wird fein alveolär strukturiert. Auch völlig von der Wirtszelle befreite Stadien, die ich als Schizogoniestadien auffassen möchte (Fig. 26, 27, 40), scheinen mir deutlich den Unterschied der männlichen und weiblichen Formen erkennen zu lassen. Die freien Leucocytozoon-Formen habe ich zumeist in der Milz, im Knochenmark und in der Lunge gefunden; im Blut sind sie weniger zahlreich.

Eine auffallende Form, die ich mit zu den Leucocytozoen rechnen möchte, gibt Fig. 45 wieder. Ich verzeichne sie hier nur, ohne vorläufig Schlußfolgerungen ziehen zu wollen.

Fig. 50 ist eine Leucocytozoonform aus dem Blute eines Fasans, der nur die langovale Parasitenform zeigte. Die Abbildung macht den Eindruck, als ob der Parasit mit dem Ausstreichen des Blutes in die Länge gezogen worden sei. Das ist aber nicht wahrscheinlich, da alle dicht um ihn liegenden Blutkörperchen völlig normal waren.

In den auf Elstern gefundenen Lausfliegen konnte ich im Magen und im Darm Leucocytozoonformen feststellen. Den ganzen Entwicklungszyklus habe ich noch nicht verfolgen können; ich hoffe, daß mir dies noch gelingen wird. Jedenfalls neige ich auf Grund meiner bisherigen Befunde der Ansicht zu, daß die oben (S. 317) beschriebene Ornithomyia die Ueberträgerin ist.

Leucocytozoen fand ich außer beim Rebhuhn und der Elster auch beim Birkwild und beim Fasan, ferner bei Auerhahn, Ringeltaube, Kiebitz, Uhu, Waldohreule, Gabelweihe, kleiner Rohrweihe, Turmfalke, Holzhäher, Nachtschwalbe, Würger, Neuntöter und Kernbeißer. Die runde und spindelförmige Form kamen nach meiner Erfahrung aber nur getrennt vor, d. h. in dem infizierten Tier war entweder nur die runde oder nur die spindelförmige Form vorhanden.

Bei der Elster fand ich, wie schon oben (S. 322) erwähnt, stets nur das runde, niemals das spindelförmige Leucocytozoon. Auf Grund dieser Befunde war ich geneigt, die runde Form als besondere Spezies aufzufassen. Nun haben schon 1912 A. Léger und Husnot[1]) bei Melierax gabar sowohl runde wie langgestreckte Formen gesehen und bei Francolinus bicalcaratus wurde von Kérandel[2]) 1909 eine langgestreckte und 1914 von A. und M. Léger[3]) eine runde Form beobachtet. Da ferner neuerdings Franchini[4]) u. a. auch aus Ardea purpurea, Parus major, Piskorina scops sowohl runde wie langgestreckte Formen beschreibt, muß ich die Frage unentschieden lassen, ob die runden Formen eine besondere Spezies darstellen, und die Möglichkeit, daß es sich nur um verschiedene Zustände der gleichen Spezies handelt, zugeben. Eine Entscheidung dürfte erst durch eine endgültige und vollständige Aufklärung des Leucocytozoon-Entwicklungskreises getroffen werden können. Falls dann die runde Form aus der Elster sich als eine besondere Art herausstellen würde, müßte sie den von Sambon[5]) 1908 aufgestellten Namen Leucocytozoon berestneffi Sambon führen. Bei Pica melanoleuca fand übrigens M. Léger[6]) ein Leucocytozoon, das er ebenfalls mit L. berestneffi Sambon identifizierte.

Auffallend scheint mir noch zu sein, daß bei manchen Vögeln, so z. B. bei der Amsel, im Sommer sich häufig nur die langgestreckten Formen zeigen, im Winter dagegen nur kugelige. Es dürfte wohl nicht auszuschließen sein, daß wir es hier im Winter mit einer abgekugelten Ruheform zu tun haben.

3. Proteosoma praecox.

Das Proteosoma praecox, der Malariaparasit der Vögel, ist bei Vögeln aller Erdteile, und zwar besonders in den Tropen und Subtropen, aber auch in den kühleren Zonen verbreitet und gefunden und beschrieben worden von Grassi und Feletti, Danilewsky, Labbé, Schaudinn, Hartmann, Wasiliewski und anderen.

Untersuchungen über das Vorkommen von Proteosoma bei unserem einheimischen Jagdwild liegen ebenfalls nicht vor, wenigstens so weit mir die diesbezügliche Literatur darüber zugänglich war. Merkliche Unterschiede zwischen den z. B. bei Sperlingen, Kanarien-

1) Léger, A., et Husnot, P., Quelques hématozoaires d'un Rapace diurne (Melierax gabar). (Bull. Soc. Path. Exot. T. 5. 1912. p. 74—77.)

2) Kérandel, J., Sur quelques hématozoaires observés au Conge. (Bull. Soc. Path. Exot. T. 2. 1909. p. 204.)

3) Léger, A. et M., Leucocytozoon d'oiseaux du Haut-Sénégal et Niger. (Bull. Soc. Path. Exot. T. 7. 1914. p. 391—395.)

4) Franchini, H., Observations sur les Hématozoaires des oiseaux d'Italie. (Ann. Instit. Pasteur T. 38. 1924. p. 479 ff.)

5) Sambon, L. W., Remarks on the avian haemoprotozoa of the genus Leucocytozoon. (Journ. Trop. Med. Vol. 11. 1908.)

6) Léger, M., Observations sur quelques Leucocytozoon d'oiseaux de la région de Reims. (Bull. Soc. Path. Exot. T. 10. 1917. p. 32.)

vögeln oder Lerchen vorkommenden Proteosomen und dem des Rebhuhns habe ich nicht feststellen können. In seinem Körperplasma lagert der Parasit ebenso wie der Malariaparasit zuerst gelbliches, später braungelbes Pigment ab. Nach der Infektion des Blutkörperchens nimmt der Kern des letzteren sehr bald eine zur Längsachse des Blutkörpers quergerichtete Lagerung ein. Bei der Schizogonie entstehen 14, 24 bis 36 Sprößlinge. In einem Blutkörperchen können mehrere Infektionen vorkommen. Weiterhin findet man im Blute runde freiliegende Parasitenformen, die Gametozyten, die eine deutliche Differenzierung aufweisen. Die Makrogametozyten zeichnen sich dadurch aus, daß in ihrem dichten Plasma neben dem feinkörnigen Pigment andere Reservestoffe sich abscheiden. Die Mikrogametozyten besitzen ein hyalines Plasma und grobkörniges Pigment. In den älteren Stadien wird das anfangs gelbgrüne Pigment braun. Irgendwelche Besonderheiten dieses beim Rebhuhn gefundenen Parasiten gegenüber dem Malariaparasiten habe ich nicht nachweisen können.

Proteosoma praecox wurde durch meine Untersuchungen festgestellt beim: Rebhuhn, Birkhuhn, Fasan, Ringeltaube, Holzhäher, Nachtschwalbe, Würger, Neuntöter, Kernbeißer.

4. Haemoproteus.

Haemoproteus ist ein Schmarotzer der roten Blutkörperchen und ist bei einer großen Reihe von Vögeln beobachtet worden. Er ist bekannt durch die Untersuchungen von Kruse, Schaudinn, Celli und Sanfelice, Danilewsky, Wülker, Reichenow und anderen. Bei unserem Vogelwild ist er meines Wissens bisher nur von Horzk beim Auerhahn gefunden worden. Horzk teilt seinen Befund mit in der „Deutschen Jägerzeitung", Bd. 62, Nr. 14.

Ebenso wie bei Proteosoma praecox habe ich auch bei Haemoproteus wesentliche Unterschiede gegenüber den bekannten Formen nicht feststellen können; ich muß daher die Frage, ob der bei unserem jagdbaren Vogelwild vorkommende Haemoproteus-Parasit mit dem der Raub- und Singvögel artengleich ist oder nicht, offen lassen. Auffallend war mir nur die außergewöhnlich reichliche Ansammlung von feinsten Volutinkörnchen in dem Mikrogametozyten, die so stark sein konnte, daß das ganze Plasma davon angefüllt zu sein schien.

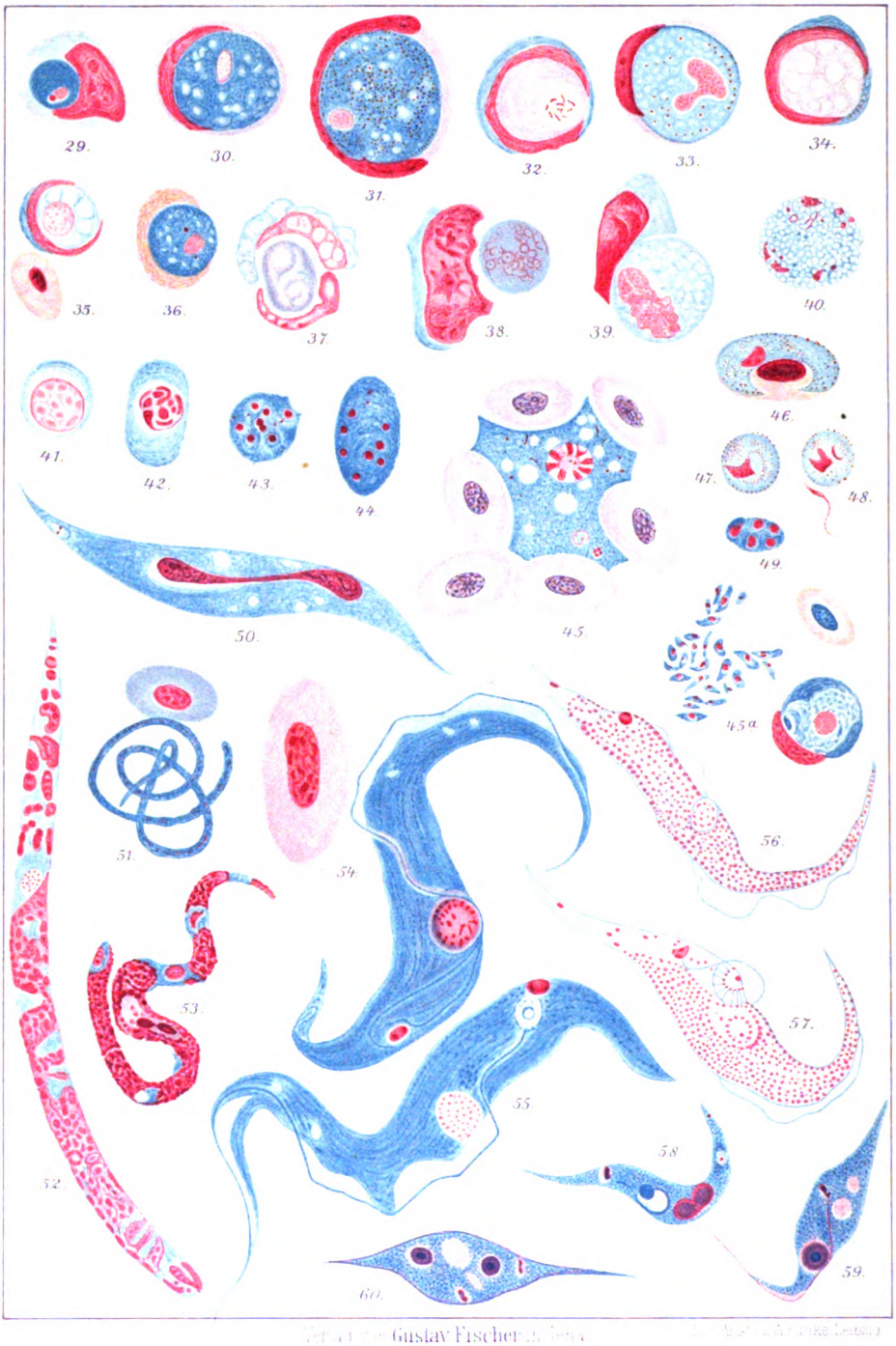
Von mir wurde Haemoproteus gefunden bei: Rebhuhn, Birkhuhn, Auerhahn, Fasan, Ringeltaube, Turteltaube, Schnepfe, Kiebitz, Rohrdommel, Waldohreule, Gabelweihe, Rohrweihe, Turmfalke, Holzhäher, Nachtschwalbe, Würger, Neuntöter, Kernbeißer.

Die Fig. 46—49 zeigen den in unserem Jagdwild gefundenen Haemoproteusparasiten.

5. Filaria.

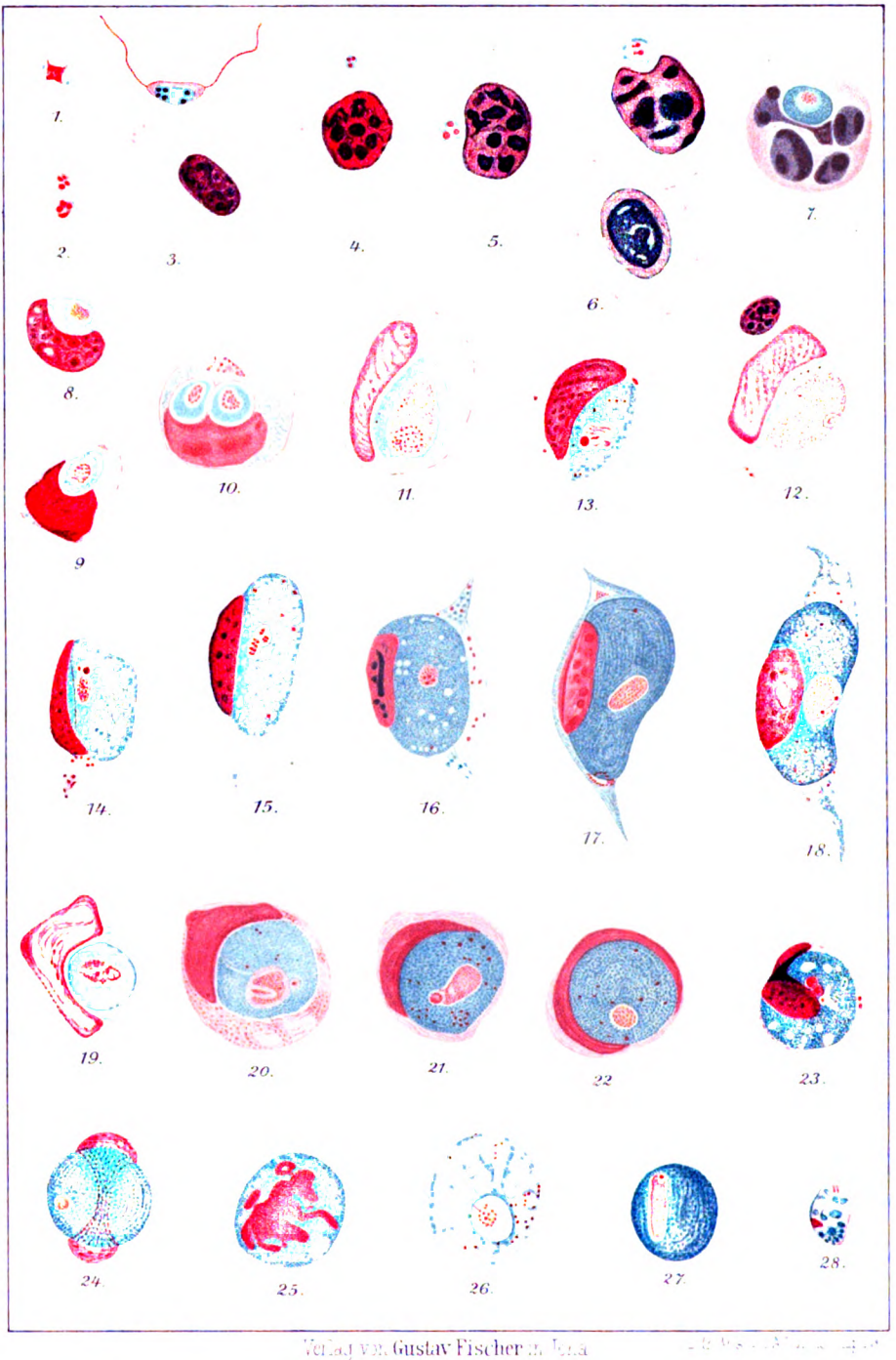
Von einer Filariasis spricht man allgemein dann, wenn mikroskopisch kleine, zarte Rundwürmer im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, wie Lymphe, Urin, auftreten, während die zugehörigen Elterntiere andere Körperstellen des gleichen Tieres bewohnen. Die Blutfilarien sind die Embryonen oder Larven von der Familie der Filariidae angehörenden Nematoden. Sie erscheinen als langgestreckte, im allgemeinen zylindrische Würmchen mit abgerundetem Vorderende und meist verjüngtem Schwanzende. Ihre Struktur ist im einzelnen noch nicht genügend erforscht, zum Teil wegen ihrer außerordent-

THE LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS



Verlag von Gustav Fischer in Jena.

THE LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS



Verlag von Gustav Fischer in Jena

lichen Durchsichtigkeit und zum Teil wegen ihrer schwer zu differenzierenden Färbbarkeit.

Die Filarien spielen eine Rolle unter den Tropenkrankheiten. Manson, Fülleborn, Loos und andere bedeutende Forscher haben ihnen ihre Aufmerksamkeit gewidmet. Ihre Zwischenwirte sind Stechmücken und Stechfliegen. Die infizierten Menschen können schwer erkranken; eine Infektion mit der Filaria bancrofti soll meist zum Tode führen.

Ueber das Vorkommen bei Vögeln habe ich in der Literatur fast nur Angaben bei englischen Autoren gefunden, wie zum Beispiel: Kennard, C. P., Notes on Filaria in birds. (Brit. Guyana med. Ann. 1902. p. 69—72.) — Symmers, William St. Clair, Note on a Filaria Larve in the blood of a blackbird. (Brit. Med. Journ. 1906. Nr. 995. Vol. 2.) — Coles, Alfred C., Triple infection of blackbird with Filariae, Trypanosome and Halteridia. (Brit. Med. Journ. 1906. Vol. 2.)

Bei unserem einheimischen Vogelwild habe ich Filarien finden können beim Rebhuhn, Birkhuhn, Fasan, bei der Ringeltaube, dem Strandläufer, der Waldohreule, Gabelweihe, Rohrweihe, dem Turmfalken, der Krähe und der Elster.

Die Abbildungen 51—53 geben 3 verschiedene Arten der bei diesen Vögeln vorkommenden Filarien wieder. Aus Fig. 51 ist an dem mitgezeichneten roten Blutkörperchen die Größe der Würmer zu erkennen.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Die Abbildungen 1—28 der Tafel I und die Abbildungen Nr. 50 bis 60 der Tafel II sind gezeichnet mit dem Abbeschen Zeichenapparat nach Giemsafärbung. Vergrößerung: Zeiß-Immersion 1,5 mm und Okular 12. Fig. 8—28 wurden bei der Reproduktion auf die Hälfte verkleinert. Die Abbildungen Nr. 29—49 der Tafel II wurden mit der Zeiß-Immersion 2 mm und dem Okular 6 hergestellt.

Fig. 1—3: Frei im Blute des Rebhuhns vorkommende Formen des Leucocytozoon (Schizonten).

Fig. 4—10: Entwicklung des Leucocytozoon im Blutkörperchen, gefunden im Blute des Rebhuhns; die Form bleibt mehr oder weniger rund, der Parasit wandert an den Rand des Kernes und dellt ihn ein.

Fig. 7: Infektion eines Leukozyten.

Fig. 10: Doppelinfektion.

Fig. 11—18: Entwicklung des langovalen Leucocytozoon im Blutkörperchen des Rebhuhns.

Fig. 19—44: Entwicklungsformen des runden Leucocytozoon, gefunden im Blute der Elster. Die früheren Stadien decken sich mit den in Fig. 1—10 wiedergegebenen Formen.

Fig. 29, 30, 31, 36: weibliche Gametozyten.

Fig. 32—35, 38—41: männliche Gametozyten.

Fig. 37: Ablösung des runden Leucocytozoon vom Blutkörperchen.

Fig. 38—44: Frei im Blute vorkommende Formen.

Fig. 45: Eine im Blute des Rebhuhns gefundene besondere Form von Leucocytozoon.

Fig. 45a: Rundes Leucocytozoon und Schizonten.

Fig. 46—49: Formen von Haemoproteus mit auffallend viel Volutinkörnchen; in Fig. 48 ein Mikrogamet. Gezeichnet nach Befunden aus dem Blute des Fasans.

Fig. 50: Ein in seiner äußeren Form an ein Trypanosom erinnerndes Leucocytozoon, gefunden beim Fasan.

Fig. 51—53: Mikrofilarien, und zwar ist Fig. 51 aus dem Blute des Birkhuhns, Fig. 52 aus dem Blute des Rebhuhns, und Fig. 53 aus dem Blute des Fasans.

Fig. 54—60: Drei verschiedene Arten von Trypanosomen, die im Vogelwild vorkommen. Die Abbildungen 54 und 55 stammen aus dem Blute des Rebhuhns, die Abbildungen 56 und 57 aus dem Blute des Fasans, die Abbildungen 58, 59 u. 60 aus dem Blute des Birkhuhns; die letzteren zeigen eine gewisse Aehnlichkeit mit Kulturtrypanosomen.

Nachdruck verboten.

Ueber den Einfluss des Chinins auf das Parasitenbild beim Protosoma.

[Aus der zoologischen Abteilung des Instituts für tropische Hygiene in Amsterdam.]

Von Dr. **W. Brünn**, Jerusalem.

Es ist bekannt, daß es beim Protosoma verschiedenartige Teilungsformen gibt, einmal solche, bei denen man 6—8 Teile findet, andererseits Teilungsformen, die 12—15—20 und mehr Teile aufweisen.

Nennen wir diese „Große Teilungsformen" (Gr. T.), die ersteren „Kleine Teilungsformen" (Kl. T.), so kann man sie bei Giemsa-Färbung folgendermaßen unterscheiden:

a) Bei der Kl. T. setzt die Teilung bereits ein, wenn der Parasit die Größe eines halberwachsenen Parasiten erreicht. Bei vollendeter Teilung nimmt der Parasit etwa $^1/_4$—$^1/_3$ des roten Blutkörperchens ein. Die Angabe von Ruge, daß die Kl. T. den Erythrozytenkern stets quer dreht, trifft häufig zu, jedoch nicht durchgehends. Die einzelnen Teile haben intensiv gefärbtes Chromatin, intensiver als bei den Gr. T., meist ist es auch reichlicher; das Plasma färbt sich dunkelblau. — b) Bei den Gr. T. ist Chromatin wie Plasma blasser; es wurden durchschnittlich 15—20 Teile gezählt; die fertige Teilungsform füllt $^2/_3$—$^1/_1$ des Blutkörperchen aus. — c) Neben diesen beiden Teilungsformen konnte ich eine 3. beobachten, wo sich unter Reduktion von Chromatin und Plasma aus einer Gr. T. eine kleinere entwickelte. Diese Gebilde haben ungefähr die Größe einer Gr. T., aber nur 9—12 Teile, daneben abgesprengte Brocken von Chromatin im Plasma oder am Rande des Parasiten liegend. Nennen wir sie „Reduzierte Teilungsformen" (R. T.).

Um festzustellen, ob diesen verschiedenen Teilungsformen eine besondere Bedeutung beizumessen ist, oder ob sie nur als Ausdruck physiologischer Schwankungen aufgefaßt werden dürfen, wurden künstlich infizierte Kanarienvögel, sobald die Parasiten im peripheren Blut erschienen, mit Chinin behandelt; es wurden 0,3 ccm einer 0,5proz. Lösung von Chin. bimur. ein- resp. mehrmals injiziert:

Vogel Nr 10: Blut am 14. 1. stark parasitenhaltig +++ erhielt am 14. 1. 0,3 ccm Chinin; am. 15. 1. +++, 16. 1. ++, 17. 1. +, 18. 1. +, 19. 1. +, 20. 1. —. 22. 1. —, 26. 1. —.

Bei der Untersuchung 20 Std. nach der Injektion war eine Wirkung in dem Sinne, daß die Parasiten irgendwie auffällig vermindert waren, nicht wahrzunehmen. Hingegen war die Einwirkung auf das mikroskopische Bild, insbesondere auf die Teilungsformen, bemerkenswert. Im lebenden Präparat fiel auf, daß sich unverhältnismäßig viel freie Parasiten im Blute befanden, und daß auch die Parasiten, die noch im Zusammenhang mit einem Blutkörperchen standen, deutlich aufgelagert erschienen, in einer viel lockeren Bindung mit dem Blutkörperchen standen, als es sonst der Fall war. Man konnte hier die Morgenrothsche „Repulsionstheorie" gewissermaßen bestätigt finden. Auffällig war ferner, daß ein großer Teil der Parasiten ungewöhnlich stark vakuolisiert war, also Degenerationserscheinungen aufwies. Ob hier eine direkte Chininwirkung vorlag, oder ob auch diese Erscheinungen mit

der „Repulsion" durch die roten Blutkörperchen zu erklären sind, läßt sich hier nicht entscheiden. Der morphologisch wichtigste Befund, der besonders schön im gefärbten Präparat erhoben werden konnte, war jedoch der, daß, während vor der Injektion die Gr. T. bei weitem überwiegen, nach der Injektion die Kl. T. das Bild beherrschen und die Gr. T. fast gänzlich verschwunden sind.

Nachstehend eine Uebersicht über die Befunde; die Prozentzahlen wurden gewonnen durch Auszählung von 200 Parasiten, in der Weise, wie es bei Auszählung von Leukozyten üblich ist. Die eingeklammerten Zahlen geben die Prozentzahlen der stark vakuolisierten Parasiten an.

Tabelle I.
Vogel Nr. 10.

Datum	Ringe Proz.	Halb-erwachsen Proz.	Kl. T. Proz.	Gr. T. Proz.	Gameten Proz.
14. 1. vor der Injektion	48	22	2	19	9
15. 1. 20 Std. nach der Injektion	23 (6)	42 (18)	31	1	3
16. 1.	38 (6)	39 (14)	13	5	5
17. 1.	40 (2)	15	17	23	5
18. 1.	9	—	22	65	4

Infolge der Chinininjektion hat sich innerhalb von 20 Std. das Verhältnis der Gr. T. zu den Kl. T. umgekehrt. Vorher 19 Proz. Gr. T. und 2 Proz. Kl. T., nachher 1 Proz. Gr. T. und 31 Proz. Kl. T. Vom 2. Tage nach der Chinininjektion, anscheinend mit dem Verschwinden des Chinins aus dem Vogelkörper, nehmen die Gr. T. wieder zu und die Kl. T. ab.

Tabelle II.
Vogel Nr. 11.

Datum	Ringe Proz.	Halber-wachsen Proz.	Er-wachsen Proz.	Kl. T. Proz.	Gr. T. Proz.	R. T. Proz.	Ga-meten Proz.
24. 1. vor d. Inj.	22	40	4	2	26	4	2
25. 1. 20 Std. nach d. Inj.	7,5 (2)	17 (1)	4,5	39,5	9,5	14	8
† nach der 2. Injektion							

Vogel Nr. 11: am 24. 1. +++, 0,25 ccm Chinin, am 25. 1. 0,3 ccm. †

Auch hier ein ähnliches Bild. Die Gr. T. verschwinden, und die Kl. T. nehmen stark zu.

Tabelle III.
Vogel Nr. 17.

Datum	Ringe Proz.	Halber-wachsen Proz.	Er-wachsen Proz.	Kl. T. Proz.	Gr. T. Proz.	R. T. Proz.	Ga-meten Proz.
4. 2. vor der Injektion	36	40	8	4	5	4,5	2,5
5. 2. nach d. 1. Injektion	12 (4)	27 (16)	8 (3)	34 (11)	2	14 (4)	3,0
6. 2. nach d. 2. Injektion	20 (3)	54 (8)	4 (0,5)	13,5 (3)	—	4 (1,5)	4,5
7. 2.	38	37 (1)	4	8 (0,5)	7	3,5	2,5
8. 2.	34	28	6	7,5	16	6	2,5
9. 2.	23	27	11	3,5	25	10	0,5
10. 2.	13,5	31	16,5	2	27	9,5	0,5

Vogel Nr. 17: am 4. 2. +++, Injektion von 0,3 Chinin, am 5. 2. +++, Injektion von 0,3 ccm Chinin, 6. 2. +++, 7. 2. +++, 8. 2. ++, 9. 2. ++, 10. 2. ++.

Tabelle IV.
Vogel Nr. 20.

Datum	Ringe	Halberwachsen	Erwachsen	Kl. T.	Gr. T.	R. T.	Gameten
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
9. 2. vor der Injektion	31	42	4	5	12	3	3,0
10. 2. nach d. 1. Injektion	15	30	10	23 (2)	6 (4)	15	1,0
11. 2. nach d. 2 Injektion	25 (6)	31 (8)	18,5(4,5)	15	2,5 (2,5)	4,5 (2)	3,5
12. 2. nach d. 3. Injektion	10 (2)	27	7 (1)	47,5 (5)	—	7 (1,5)	1,5
13. 2.	6	60	3	24 (3)	2	4 (2)	1*)
14. 2.	10	32 (2)	5	35 (9)	5	9	4*)
16. 2.	Ganz vereinzelt						

*) Infolge der geringen Zahl wurden hier nur 100 Parasiten ausgezählt.

Vogel Nr. 20: am 9. 2. +++, Injektion von 0,3 ccm Chinin, 10. 2. +++, Injektion von 0,3 ccm Chinin, 11. 2. ++, Injektion von 0,3 ccm Chinin, 12. 2. +, 13. 2. +, 14. 2. +, 16. 2. +, ganz vereinzelt.

In diesen beiden Fällen wurde durch mehrmalige Injektion von Chinin bewirkt, daß vorübergehend Gr. T. überhaupt nicht wahrgenommen werden konnten.

Eine eindeutige Erklärung für die hier beobachteten Erscheinungen zu geben, dürfte schwierig sein. Man könnte an Nahrungsmangel infolge „Repulsion" denken, demzufolge weniger Merozoiten gebildet werden können, naheliegender wäre jedoch, anzunehmen, daß aus den Kl. T. hauptsächlich geschlechtliche Formen entstehen, und daß nun infolge einer Schädigung, hier durch Chinin, die mehr vegetativen Teilungsformen, d. h. die Gr. T., nicht entwickelt werden.

Literatur.

Ruge, R., Kolle-Wassermann. Bd. 1. 1903. — Ders., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 29. — Hartmann, Arch. f. Protistenk. Bd. 10. 1907. — Anschütz, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 54. 1910. — Kopanaris, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. 15. 1911. — Brug, S. L., Ibid. Bd. 20. 1916. — Ders., Tijdschr. v. Vergel. Geneesk. D. 2. 1917. — Brünn, W., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 79. 1917. — Morgenroth, J., Dtsch. med. Woch. 1918. Nr. 35.

Abgeschlossen im Februar 1920.

Nachdruck verboten.

Enzootische Erkrankungen von Truthühnern und Kanarienvögeln durch Bakterien aus der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie (Paracholera).

[Aus dem Tierseucheninstitut der Universität Leipzig (Direktor: Prof. Dr. A. Eber).]

Von Dr. **A. Beck** und Dr. **W. Huck.**

Mit 2 Abbildungen im Text.

Gegenüber dem wiederholt beobachteten und eingehend beschriebenen Massensterben von Kanarienvögeln, die durch Angehörige der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie hervorgerufen wurden, sind über gleichartige Erkrankungen bei Puten kaum Angaben in der Literatur zu finden.

Plasaj und Přibram (15) führen in ihrer Arbeit „Zur Morphologie der Bacteria multoseptica" einen Stamm an, der von Magnusson als Erreger einer Truthahnseuche festgestellt und mit dem von Zwick (23) beschriebenen Erreger einer Kanarienvogelseuche als wahrscheinlich identisch zu betrachten ist.

Zeiß (20), der selbst eine derartige Kanarienvogelseuche zu beobachten Gelegenheit hatte, bringt in seiner Veröffentlichung eine übersichtliche Zusammenstellung sowohl der morphologischen und kulturellen Eigenschaften der jeweils ermittelten Seuchenerreger als auch der pathologischen Veränderungen, die bei den einzelnen Seuchengängen festgeselltt worden sind. Dieser Autor unterscheidet 3 Gruppen von Erkrankungen, deren erste die durch Bakterien der hämorrhagischen Septikämie verursachten Seuchen umfaßt. Dieser Gruppe rechnet er die von Kern (9), v. Wasielewski u. Hoffmann (19), Pfaff (13), Zwick (23), Mießner u. Schern (11), Zeiß (20) sowie die von Zürn (22), Friedberger u. Fröhner (6) und Sticker (18) mitgeteilten Kanarienvogelseuchen zu. Obwohl die von den einzelnen Autoren festgestellten Krankheitserreger hinsichtlich ihrer morphologischen und kulturellen Eigenschaften nicht unerhebliche Unterschiede zeigen, stimmen die Zerlegungsbefunde bei den Enzootien von v. Wasielewski u. Hoffmann, Pfaff, Zwick u. Mießner und Schern darin überein, daß in der Milz und in der Leber zahlreiche gelbe, nekrotische, verkästen Tuberkeln ähnliche Knötchen gefunden wurden, die bei der Kernschen Seuche vermißt, bei der von Zeiß beschriebenen nur einmal bei einem Impftier festgestellt wurden. Mießner u. Schern (11) berichten außerdem über gleichzeitige diphtherische Beläge auf der Rachenschleimhaut. Diese Veränderungen veranlaßten die beiden Autoren, die Krankheit als „infektiöse Nekrose der Kanarienvögel" zu bezeichnen.

Die 2. Gruppe von Zeiß schließt die durch das Bacterium paratyphi B und seine Verwandten ausgelösten Kanariensterben ein, zu denen die Epidemien von Joest (8), Pfeiler (14), Adam u. Meder (1), Gilruth (7) und Zsûpan (21) gehören. Derselben Gruppe wären ferner die von Manninger (10) bei Finken beobachtete und die neuerdings von Otto (12) und Beck u. Huck (2) mitgeteilten Seuchen bei Kanarienvögeln zuzurechnen.

Die von Rieck (17) und Freese (5) festgestellten Enzootien bei Kanarienvögeln, deren Erreger zu denen der beiden ersten Gruppen keine Beziehungen haben, bilden nach Zeiß die 3. Gruppe.

Im Gegensatz zu Zeiß rechnet Binder (4), dessen Arbeit ungefähr gleichzeitig erschienen ist, die Rieckschе Seuche zur „infektiösen Nekrose", wie er auch in Anlehnung an die von Mießner und Schern gewählte Benennung seine eigenen Fälle, die aus drei verschiedenen Seuchenherden stammen, als infektiöse Nekrose bezeichnet. Bezüglich der von Kern beschriebenen Seuche läßt er die Frage der Zugehörigkeit zu den von Zeiß in der 1. Gruppe genannten Erkrankungen offen. Bei den Befunden von Binder ist besonders bemerkenswert, daß er neben den charakteristischen Nekroseherden in Milz und Leber verschiedentlich ähnliche Herde am Kehlkopf und in der Rachenwand, im Darme und gelegentlich im Gehirn, Myokard und in den Lungen feststellen konnte. Auch Veränderungen an den Blinddärmen, die vergrößert und mit käsig-bröckligen Massen erfüllt waren, konnten beobachtet werden.

Reinhardt (16) behandelt in dem Handbuch der Geflügelkrankheiten in einem besonderen Abschnitt eine Reihe von geflügelcholera-ähnlichen Erkrankungen bei verschiedenen Geflügelarten, darunter auch die von Mc Fadyean und später von Jowett beschriebene enzootische Pneumopericarditis bei Truthühnern, als deren Erreger ein Bakterium festgestellt wurde, das dem der Geflügelcholera zwar ähnlich, aber beweglich und für Hühner und Wassergeflügel nicht pathogen war.

Im Laufe der Jahre 1923 und 1924 wurden im Tierseucheninstitut der Universität Leipzig aus dem reichhaltigen Geflügelsektionsmaterial 5 Stämme (St. 313, 324, 558, 597, 601) als Erreger von Putenenzootien und 1 Stamm (St. 481) als Ursache eines Kanariensterbens isoliert, die uns wegen ihres gleichartigen morphologischen und kulturellen Verhaltens zu vergleichenden biologischen und tierexperimentellen Prüfungen veranlaßten. Unsere Untersuchungsergebnisse, die wir nachstehend mit den wichtigsten Merkmalen des Zerlegungsbefundes mitteilen, ergaben ein übereinstimmendes Verhalten aller Stämme sowohl in der Kultur als auch im Tierexperiment, sodaß über die Identität der Putenstämme und des Kanarienvogelstammes kein Zweifel besteht.

Bei der Erhebung des Vorberichtes wurde besonderer Wert auf die Feststellung gelegt, daß es sich tatsächlich um einen seuchenhaften Verlauf in dem betroffenen Bestande handelte. Alle Berichte heben übereinstimmend hervor, daß mehrere Tiere hintereinander gestorben waren. Die Tiere trauerten 2—4 Tage, sträubten das Gefieder und versagten das Futter. Der Tod erfolgte fast immer plötzlich.

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen bestanden in Darm- und Lungenentzündung; in der Leibeshöhle war eine seröse, fast klare Flüssigkeit vorhanden, Leber und Milz waren erheblich vergrößert und ließen zahlreiche grauweiße, stecknadelkopf- bis hirsekorngroße Herdchen erkennen.

Der Nachweis der Erreger gelang im Kulturverfahren regelmäßig aus der Leber und Milz, seltener aus Darm und aus der Lunge, nur ausnahmsweise dagegen aus dem Herzblut. Es handelte sich um 1—3 μ lange und 1 μ breite Stäbchen, die unbeweglich und gramnegativ waren. Ihre Gestalt war des öfteren kokkenartig. Geißeln konnten nicht festgestellt werden. Bei der Züchtung auf verschiedenen Nährsubstraten wiesen sie besondere Eigentümlichkeiten auf. Besonders gut war das Wachstum auf 2proz. Agar und auf Endoagar. Auf ersterem bildeten sie nach 24stdg. Bebrüten stecknadelkopfgroße klare Einzelkolonien mit etwas dichterem Zentrum. Bei der Besichtigung nach 2 Tagen waren sie ungefähr hanfkorngroß, klar und durchsichtig, die Oberfläche gewölbt. Die Kolonien veränderten den Farbenton des Endoagars nicht, nur zuweilen erschien das Zentrum leicht rosa verfärbt. Auf Malachitgrünagar war nur selten und dann erst nach mehreren Tagen spärliches Wachstum zu erzielen. Auch auf der Gassner-Platte war gutes Wachstum vorhanden. Sehr charakteristisch war das Verhalten der Keime auf Drigalski-Agar. Näch 24stdg. Bebrüten konnten nur selten feinste Kolonien festgestellt werden. Meist erst nach 48 Std. kamen kleine kugelige Kolonien zum Vorschein, die denen der hämorrhagischen Septikämie sehr ähnlich waren. Bei spärlicher Aussaat entwickelten sie sich sehr kräftig und glichen in Größe und Form den Kolonein der Coli-Typhusgruppe. Auf das Verhalten der Keime auf Drigalski möchten wir ganz besonders hinweisen. Eine Virulenzverminderung der von der Drigalski-Platte abgeimpften Keime konnten wir nicht feststellen.

Die vergleichende Nachprüfung der Stämme in der „bunten Reihe". wobei auch je ein Typhus- und Hühnertyphusstamm sowie drei Geflügelcholerastämme vom Huhn, je ein Septikämiestamm von der Katze und dem Kaninchen herangezogen wurden, erfolgte in mehreren Versuchsgängen. Die 5 Putenstämme und der Kanarienstamm 481 zeigten ein unveränderliches biochemisches Verhalten, wie es Tabelle I von Stamm 481 wiedergibt. (Siehe Tab. I, S. 333.)

Die Tierpassagestämme (Maus und Kanarienvogel) wichen von den Originalkulturen nicht ab. Eine Ausnahme hiervon machten nur die Stämme 313 und 324 im Mauspassagestamm, worauf wir bereits in einer früheren Arbeit (3) hingewiesen haben.

Besonders typisch war das Verhalten der Keime gegenüber Traubenzucker, in welchem sie stark Säure bildeten. Demzufolge war die Barsiekow-I-Lösung bereits nach 24 Std. vollkommen ausgefällt und die über dem Bodensatz stehende Flüssigkeit wasserklar. Dulzit und Sorbit wurden niemals verändert; die Mannitlösung zeigte nach 24 Std. Säurebildung und Schwebefällung, nach 72 Std.

Tabelle I.
Stamm 481. — „Bunte Reihe".

Ergebnis nach dem	Bouillon													
	Glykose	Laktose	Saccharose	Arabinose	Rhamnose	Maltose	Milch	Lackmusmolke	Neutralrotagar	Barsiekow I	Barsiekow II	Mannit	Dulzit	Sorbit
Tage	klar, grobe Flokken Bo.	klar, Flokken Bo.	klar, feine Flokken Bo.	klar, feine Flokken Bo.	klar, feine Flokken Bo.	S. Schw [3])	nichtgeronnen	blauviolett	o. V	S.[1]), Ge.[2])	o. V.	S. Schw.	o. V.	o. V.
„	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	S. Ge.	„	„
„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„
Endergebnis	S.	o. V.	o. V.	S.	S.	S. Schw.	nichtgeronnen	blauviolett	o. V.	S. Ge.	o. V.	S. Ge.	o. V.	o. V.

1) S. = Säure, 2) Ge. = Gerinnung, Schw. = Schwebefällung.

vollkommene Ausfällung (Gerinnung). Lackmusmolke Kahlbaum nahm bereits nach 24 Std. einen blauvioletten Farbenton an, den sie bis zum Abschluß der Prüfung beibehielt. Milch wurde nicht zur Gerinnung gebracht. Gasbildung fehlte in allen Zuckerarten. Neutralrotagar blieb immer unverändert. Auffallend war das Wachstum der Keime in flüssigen Nährmedien; in Traubenzucker-, Milchzucker-, Saccharose-, Arabinose-, Rhamnosebouillon riefen sie keine gleichmäßige Trübung hervor. Die Bouillon blieb entweder klar oder klärte sich in wenigen Tagen; am Boden der Röhrchen bildete sich ein loser flockiger Bodensatz, der in Traubenzuckerbouillon besonders stark war und in Reagenzröhrchen normaler Weite bisweilen eine Höhe von 1 ccm erreichte. Die Gärröhrchen und die Wände der Reagenzgläser waren verschieden dicht von einem Netz von Flocken überzogen, die in Traubenzuckerbouillon grob, in Saccharose- und Arabinosebouillon feiner waren. Indolbildung wurde stets vermißt.

Die Heranziehung der bereits erwähnten Vergleichsstämme erfolgte hauptsächlich deshalb, weil es uns auf serologischem Wege nicht gelang, eine Abgrenzung der Stämme von der Coli-Typhusgruppe zu erreichen, da unsere 6 Stämme eine nicht zu überwindende Neigung zur Spontanagglutination besaßen. Diese Abgrenzung erschien uns aber deshalb notwendig, weil der anatomische Befund bei der Zerlegung der Puten eine große Aehnlichkeit mit dem teils bei Hühnertyphus, teils bei Geflügelcholera auftretenden Sektionsbilde aufwies. Eine Abtrennung gegenüber den Keimen der Geflügelcholera erschien uns nur auf dem Wege der biochemischen Differenzierung aussichtsreich.

Der Typhus humanus unterschied sich von unseren Keimen in seinem Verhallten gegenüber Arabinosebouillon, Sorbit und Lackmusmolke, indem er erstere unverändert ließ, in Sorbit Säure bildete und Lackmusmolke rötete.

Der von uns geprüfte Pfeilersche Originalhühnertyphusstamm veränderte Arabinose nicht und bildete in Dulzit Säure. Er wich somit biochemisch in nur wenigen Punkten ab.

Die vergleichende Untersuchung mit den 5 Septikämiestämmen wurde dadurch etwas erschwert, daß sowohl die Geflügelcholera-

stämme untereinander als auch die beiden Stämme von Katze und Kaninchen geringe Unterschiede in ihrem Säurebildungsvermögen den verschiedenen Zuckerarten gegenüber aufwiesen. Wichtige Unterscheidungsmerkmale unsern 6 Stämmen gegenüber lieferten die Saccharose, die Lackmusmolke und der Mannit. Die beiden letztgenannten Nährmedien wurden von den Septiekämiestämmen nicht verändert; in der Saccharose dagegen war Säurebildung vorhanden.

Im Tierversuch töteten alle 6 Stämme weiße Mäuse bei subkutaner Infektion innerhalb 6—10 Tagen. Neben Darmentzündung, die bisweilen wenig ausgeprägt war, bestand erheblicher Milztumor. Die vergrößerte Leber zeigte meist kleinste nekrotische Herdchen. Die Züchtung aus Milz, Herzblut und Darm gelang regelmäßig.

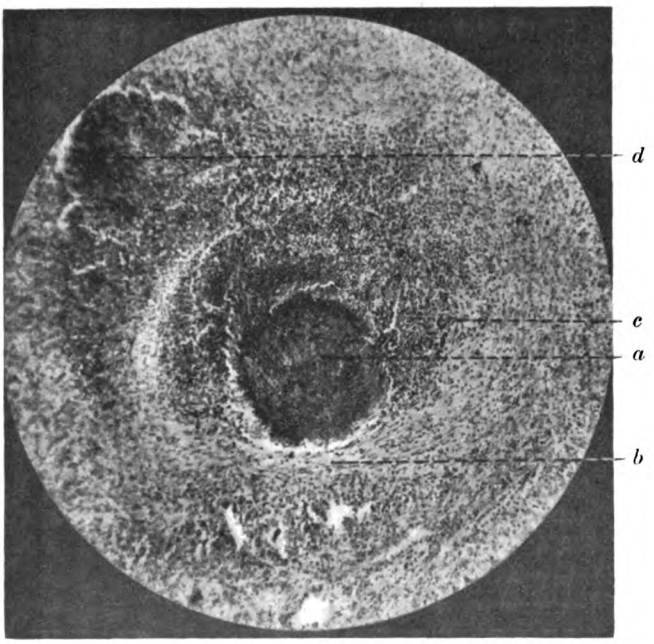


Fig. 1. 2 Nekroseherdchen aus der Leber vom Kanarienvogel. *a* Nekrotisches Zentrum eines stark verkästen Herdes, *b* Bindegewebskapsel, *c* Riesenzelle, *d* jüngeres Herdchen mit beginnender zentraler Verkäsung. (Vergr. 1 : 80.)

Die Fütterungsversuche schlugen fehl. Nur Stamm 597 tötete die gefütterte Maus innerhalb von 6 Tagen.

Zwecks Prüfung ihrer Pathogenität für Kanarienvögel wurde zunächst jeder der 6 Stämme an ein ausgewachsenes Kanarienweibchen verfüttert. Bei der Auswahl für die Fütterungsversuche wurde Bedacht darauf genommen, daß möglichst gleichstarke Tiere, die in Einzelkäfige gesetzt wurden, Verwendung fanden. Für den Kanarienstamm 481 wurde ein vollkommen grüngefärbtes Weibchen, die erfahrungsgemäß widerstandsfähiger sind, ausgewählt. Nach eintägigem Fasten erhielten die Tiere die Kulturaufschwemmung in gekochtem Eigelb. Die Tiere wurden öfters kontrolliert, und auch der Darminhalt gelegentlich auf das Vorhandensein der Keime untersucht. Die Krankheitsdauer betrug bei 3 Tieren 9 Tage, in 1 Falle (St. 481) 13 Tage,

und bei St. 313 einmal 25, im Wiederholungsversuch sogar 35 Tage. St. 324 tötete im Fütterungsversuch nicht. Auch konnten hier in den Darmausscheidungen die Keime nicht nachgewiesen werden.

Die offensichtliche Erkrankung der Tiere setzte verhältnismäßig spät ein. Erst wenige Tage vor dem Tode zeigten die Tiere verminderte Munterkeit, Sträuben des Gefieders und beschleunigte Atmung. Futter- und Wasseraufnahme waren nicht unterdrückt. Kurz vor dem Tode plusterten sich die Tierchen stark auf, versteckten den Kopf im Gefieder und atmeten außerordentlich angestrengt.

Die Sektion der Kanarienvögel ergab einen einheitlichen Befund. Der Dünndarm war mehr oder weniger stark entzündet; Leber und Milz waren erheblich vergrößert, die erstere braungelb und von zahlreichen stecknadelspitzengroßen, gelben Nekroseherdchen durchsetzt. Besonders charakteristisch waren die Milzveränderungen. Makroskopisch boten sie das Bild einer tuberkuloseähnlichen Erkrankung. Knötchen in der Größe eines Stecknadelkopfes bis eines Hanfkornes reihten sich nebeneinander, so daß das Milzparenchym stellenweise fast völlig verdrängt war. Diese Knötchen waren gelb bis gelbbraun gefärbt und verliehen der Milz durch Vorwölbung der Kapsel ein höckeriges Aussehen. Ihre Schnittfläche war trocken-käsig. Der mit St. 313 per os infizierte Kanarienvogel, der erst 35 Tage nach der Injektion gestorben war, zeigte außerdem noch je ein hirsekorngroßes Knötchen unter der Haut über dem Brustmuskel und im Bereiche des rechten Schultergelenks. Diphtherische Beläge in der Rachenhöhle konnten wir nicht beobachten.

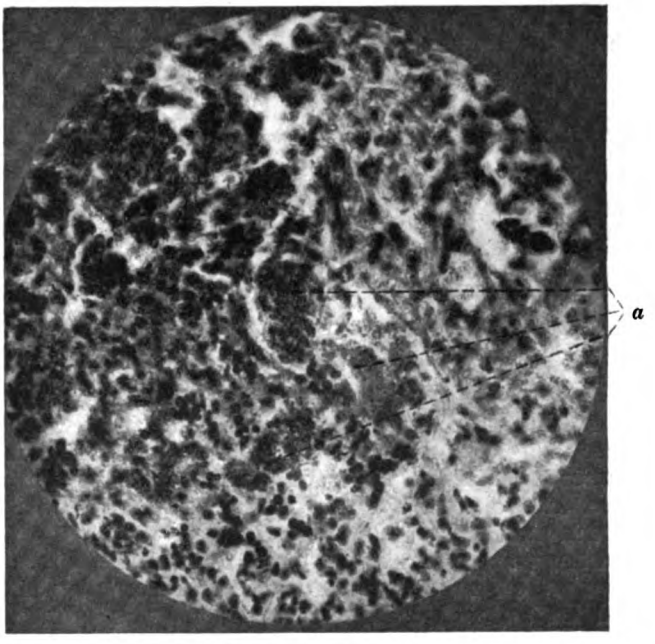


Fig. 2. Herdchen aus der Milz eines Kanarienvogels. *a* Randzone des Herdchens mit zahlreichen Bakterienhaufen. (Vergr. 1:600.)

Mikroskopisch zeigten die Herde der Milz und Leber eine deutliche ringförmige Schichtung (Fig. 1). Der zentrale Teil der Knötchen

war strukturlos und zeigte nur noch selten Reste von Kernen, während in den mittleren Schichten die Zellkerne mehr oder weniger gut erhalten waren. Die Randpartien bestanden aus Leukozyten, vereinzelten Riesenzellen und Haufen von Bakterien (Fig. 2). An diesen Stellen waren nur spärlich Fibroblasten festzustellen. Die Bakterien wuchsen hier ungehemmt in das blutreiche Nachbargewebe ein. An anderen Herdchen wiederum hatte sich ein Teil des verkästen Zentrums einseitig mit einer deutlichen Bindegewebskapsel umgeben, während am anderen Pol der nekrotisierende Entzündungsprozeß fortschritt und mit Nachbarherdchen konfluierte.

Zu Vergleichszwecken wurde je ein Kanarienvogel per os mit einem Paratyphus-, Hühnertyphus- und einem Geflügelcholerastamm infiziert. Der Tod dieser Tiere erfolgte bei Hühnertyphus innerhalb von 2, bei Geflügelcholera in 3 und bei Paratyphus innerhalb 6 Tagen. In keinem Falle waren die beschriebenen Milzkknötchen vorhanden. Milz und Leber waren geschwollen. Feinste Lebernekrosen wurden nur bei dem mit Paratyphus infizierten Tiere gefunden. Darmentzündung lag bei allen 3 Kanarienvögeln vor. In allen Fällen wurden die verfütterten Keime aus den Organen in Reinkultur gezüchtet.

Die Agglutinationsversuche der 6 Stämme ergaben kein verwertbares Resultat, da sämtliche 6 Stämme bei ihrer Prüfung mit den eigens hergestellten homologen Kaninchensera ebenso wie mit Typhus-, Hühnertyphus-, Schottmüller-, Breslau-, Suipestifer- und Gärtnersera starke Spontanagglutination, die auch in Kochsalzlösung und Normalserum auftrat, zeigten.

Die mit dem Putenstamm 597 und dem Kanarienstamm 481 hergestellten Kaninchensera agglutinierten Hühnertyphus-, Typhus-, Schottmüller-, Breslau-, Ferkeltyphus-, Gärtner-, Abortus equi-Stämme und die Stämme 313 und 324, die im Laufe der Weiterzüchtung ihre Neigung zur Spontanagglutination erheblich eingebüßt hatten, in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:200, so daß aus diesem Verhalten ebenfalls ein die Typenzugehörigkeit klärender Schluß nicht gezogen werden konnte.

Die Prüfung der Extrakte aller 6 Stämme im Komplementbindungsversuch mit Sera von Typhus, Hühnertyphus, Schottmüller und Enteritis Breslau ergab nur schwache Bindung bis 0,1, während die homologen Extrakte dieser Stämme bis 0,001 bzw. 0,0005 die Hämolyse hemmten.

Zusammenfassend kann über das Ergebnis der Versuche zur serologischen Differenzierung der Stämme gesagt werden, daß sich keine Anhaltspunkte dafür ergeben haben, daß die fraglichen 6 Stämme Beziehungen zur Coli-Typhusgruppe haben. Besonders erwähnt sei bezüglich der Stämme 313 und 324, daß sich unsere frühere Annahme, daß diese Stämme dieser Gruppe als atypische Vertreter zugehören, nicht bestätigt hat.

Schlußbetrachtung.

Die morphologische, kulturelle, biochemische, serologische und tierexperimentelle Prüfung der 6 untersuchten Stämme, von denen 5 aus Putenenzootien und 1 bei einem Kanariensterben isoliert worden waren, hat gezeigt, daß Unterschiede zwischen diesen Stämmen nicht bestehen.

Ihr Verhalten war ein durchaus konstantes. Sie sind sowohl von den Erregern der Geflügelcholera, der Kaninchen- und Katzenseptikämie einerseits, von der Coli-Typhusgruppe andererseits durch wohlcharakteristische Merkmale zu unterscheiden. Hierbei ist allerdings zu beachten, daß die 6 Stämme dem Hühnertyphus Pfeiler morphologisch und biochemisch sehr nahe stehen. Es erscheint uns daher die Annahme nicht ganz unbegründet, daß letzterer eine Varietät der hämorrhagischen Septikämie oder mindestens eine Zwischenform zwischen der letztgenannten und dem Typus humanus vorstellt. Jedenfalls ist der Hühnertyphusbazillus der einzige unbewegliche Angehörige der Typhus-Paratyphusgruppe.

Trotz der deutlichen biochemischen Differenzen gegenüber den genannten Septikämiestämmen, die durch deren starke Variabilität unschwer zu erklären sind, müssen die von uns untersuchten 6 Stämme der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie zugerechnet werden. Legt man die von Plasaj und Přibram (l. c.) gegebene Einteilung der „Bacteria multoseptica" der Gruppierung zugrunde, so lassen sich die 6 Stämme mühelos dem Typus α eingliedern, für welchen die Geißellosigkeit, die fehlende Gas- und Indolbildung und die Nichtgerinnung der Milch von den genannten Autoren als charakteristisch angesehen werden. Dieser Typus α umfaßt die von Klein beschriebenen Bac. gallinarum und Bac. phasianicida, ferner die Erreger der Kanarienvogelseuche von Binder (l. c.) und der Truthahnseuche von Magnusson[1]). Die Erreger der Kanarienvogelseuche von Pfaff (l. c.) und Zeiß (l. c.) werden dem Typus β zugerechnet.

Die morphologischen und biochemischen Eigenschaften sowie die pathologisch-anatomischen Veränderungen, die wir auf dem Fütterungswege mit den 5 Stämmen bei den Kanarienvögeln erzeugen konnten, lassen keinen Zweifel, daß es sich um Keime handelt, die mit den von Zeiß in seiner Gruppe I als Erreger von Enzootien bei Kanarienvögeln und auch mit den von Binder beschriebenen identisch sind. Die von Magnusson bereits vermutete Identität seiner Truthahnseuche mit der von Zwick (l. c.) beschriebenen Kanarienvogelseuche findet durch unsere Fütterungsversuche ihre Bestätigung, da es gelungen ist, einen großen Teil jener Veränderungen bei den Versuchsvögeln zu erzeugen, wie sie von den mehrfach genannten Autoren als Erscheinungen selbständiger Kanarienvogelseuchen ermittelt wurden. Als konstanteste Merkmale fanden sich neben dem walzenförmigen Milztumor mit stecknadelkopf- bis hirsekorngroßen tuberkelähnlichen Knötchen gleichartige Nekroseherdchen in der Leber, die wir bei den zahlreichen Infektionen mit Bac. enteritidis Breslau ebenso wie bei Geflügelcholera stets vermißt haben. Zwar konnten auch bei diesen Infektionen zuweilen Milz- und Leberschwellungen und bei ersterer auch kleinste grauweiße

1) Zit. nach Plasaj und Přibram (15).

Nekroseherdchen beobachtet werden, doch erreichten sie nie auch nur annähernd die Größe und das Aussehen wie bei den Infektionen mit unsern Versuchsstämmen.

Das Vorliegen der genannten Nekroseherde sowie diphtherischer Beläge in der Rachenwand veranlaßte Mießner und Schern (l. c.), die von ihnen beschriebene Krankheit als „infektiöse Nekrose der Kanarienvögel" zu bezeichnen, eine Nomenklatur, der sich Binder (l. c.) und Reinhardt (l. c.) anschlossen. Die Befunde, wie sie an den Puten erhoben werden konnten, bei welchen Milz- und Leberschwellung mit kleinsten grauweißen Nekroseherdchen nie vermißt wurden, deuten darauf hin, daß die makroskopisch tuberkelähnlichen Nekrosen in Milz und Leber der Kanarienvögel eine spezifische Reaktion des Organismus dieser Vogelart auf die Infektion mit Varietäten von Erregern aus der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie darstellen. Bei den Puten waren sie in diesem Ausmaße nicht anzutreffen und ließen sich nicht von Nekroseherdchen anderer spezifischer Infektionen (Geflügelcholera, Hühnertyphus u. a.) trennen. Da diesen Nekrosenherden in den Organen der Puten keine pathognostische Bedeutung beizumessen ist, halten wir trotz der Identität oder nahen Verwandtschaft unserer Keime mit den Erregern der verschiedenen Kanariensterben eine Benennung der fraglichen Erkrankungen als infektiöse Nekrose der Puten nicht für angezeigt. Die Bezeichnung Paracholera der Puten würde unseres Erachtens sowohl dem klinischen Verlauf, den pathologischen Veränderungen als auch der Zugehörigkeit der Erreger zur Gruppe der hämorrhagischen Septikämie Rechnung tragen. Diese Bezeichnung würde es ermöglichen, gleichartige Erkrankungen anderer Geflügelarten, deren Erreger als Angehörige der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie bestimmt werden, unter dem Sammelnamen Paracholera ebenfalls zusammenzufassen.

Die technische Assistentin des Instituts, Fräulein Schnädelbach, unterstützte uns bei der Ausführung der Untersuchungen, wofür ihr an dieser Stelle ebenfalls gedankt sei.

Nachtrag bei der Korrektur.

Im März d. Js. wurde aus Leber und Milz einer Taube, die bei der Zerlegung zahlreiche miliare Nekrosen in den genannten Organen zeigte, ein Stamm isoliert, der mit den in der Arbeit beschriebenen Stämmen kulturell und biochemisch völlig übereinstimmte. Der Stamm tötete bei der Fütterung einen Kanarienvogel innerhalb von 10 Tagen. Dieser zeigte neben zahlreichen stecknadelkopf- bis hirsekorngroßen gelben Nekroseherdchen in der Milz zahlreiche graugelbe, stecknadelspitzen- bis kleinerbsengroße Herdchen in beiden Lungen. Dieser Fall zeigt, daß die beschriebenen Stämme nicht gar so selten sind und anscheinend bei allen Vogelarten vorkommen können.

Literatur.

1) Adam u. Meder, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 62. 1912. S. 569. — 2) Beck u. Huck, Tierärztl. Rundsch. 1924. S. 3. — 3) Dies., Centralbl. f.

Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924. S. 397. — 4) Binder, Wien. tierärztl. Woch. Bd. 1. 1914. S. 337. — 5) Freese, Dtsch. tierärztl. Woch. 1907. S. 501. — 6) Friedberger u. Fröhner, Lehrb. d. Spez. Path. u. Therapie. 1904. — 7) Gilruth, The Veterin. Journ. Vol. 17. 1910. — 8) Joest, Ber. über d. Tierärztliche Hochschule Dresden f. 1906. Dresden 1907. — 9) Kern, Dtsch. Ztschr. f. Tiermed. Bd. 22. 1897. S. 171. — 10) Manninger, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 70. 1913. S. 12. — 11) Mießner u. Schern, Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. Bd. 34. S. 133. — 12) Otto, Beitrag zu seuchenhaften Paratyphuserkrankungen bei Kanarienvögeln. [Vet.-med. Diss.] Berlin 1922. — 13) Pfaff, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 38. 1905. S. 275. — 14) Pfeiler, Berl. tierärztliche Woch. 1911. Nr. 52. — 15) Plasaj u. Přibram, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 87. 1921. S. 1. — 16) Reinhardt, Handbuch der Geflügelkrankheiten. 1922. — 17) Rieck, Ztschr. f. Tiermed. Bd. 15. 1889. — 18) Sticker, Arch. f. Tierheilk. Bd. 14. 1888. S. 334. — 19) Wasielewski u. Hoffmann, Arch. f. Hyg. Bd. 47. 1903. S. 171. — 20) Zeiß, Arch. f. Hyg. Bd. 82. 1914. S. 1. — 21) Zsúpan, zit. nach Ellenberger u. Schütz, Jahresber. 1909. S. 352. — 22) Zürn, Blätter f. Geflügelzucht. Dresden 1884. S. 326. — 23) Zwick, Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 4. 1908. S. 33.

Nachdruck verboten.

Ein Fall von spontaner Infektion mit Novys Bazillus (Bac. oedematiens Weinberg und Séguin) bei einem Schwein.

[Mitteilung aus dem bakteriologischen Laboratorium der Kopenhagener Markt- und Schlachthallen.]

Von Tierarzt **E. Mejlbo**, Kopenhagen.

Bei Untersuchungen über Milchnuklein wies Novy zufällig einen pathogenen Anaërobionten nach, den er 1894 unter dem Namen Bac. oedematis II beschrieb. In demselben Jahre isolierte Kerry einen pathogenen anaëroben Bazillus aus einem Ochsen, der an einer milzbrandemphysemähnlichen Krankheit verendet war. Dieser Bazillus wurde später von Kruse mit Novys Bazillus identifiziert. v. Hibler isolierte in 3 Fällen Bazillen des Novy-Typus, nämlich in 1 Fall aus einem Kaninchen (7. 3. 1904, Stamm 2), das nach Impfung mit Erde starb, in 1 Fall (14. 6. 1916, Stamm 3) aus einem Wildschwein, das unter Milzbrandemphysemerscheinungen gestorben war, und schließlich in 1 Fall aus der Lippe einer Frau, die unter septikämischen Erscheinungen gestorben war (1. 5. 1907, Stamm 4).

Im Mai 1915 isolierten Weinberg u. Séguin einen sehr pathogenen anaëroben Bazillus, der einige Monate später mit einigen anderen, von ihnen isolierten Bazillen identifiziert wurde; sie beschrieben ihn unter dem Namen Bac. oedematiens.

Während des Weltkrieges wurde dieser Bazillus mehrmals, u. a. von Costa u. Troisier (1915), Legros (1917), Dalyell (1917) und dem englischen „Medical Research Committee“ (1917—1919) als spontane Ursache des „Gasbrandes“ bei Menschen nachgewiesen.

Sowohl Novys, Kerrys als v. Hiblers Beschreibungen von Novys Bazillus wichen in mehreren Beziehungen, speziell bezüglich des Vermögens der Sporenbildung und Peptonisierung von Gelatine, von Weinberg u. Séguins Beschreibung des Bac. oedematiens

ab. Durch einige direkt vergleichende Untersuchungen der beiden Bazillenstämme wiesen Weinberg u. Séguin indessen nach, daß trotz der Literaturangaben eine sehr weitgehende Uebereinstimmung zwischen den als verschiedene Typen beschriebenen Bazillen besteht.

Die Identität war aber nicht ganz sicher festzustellen, da Novys Originalstamm seine Virulenz eingebüßt hatte.

Da Novys, Kerrys und v. Hiblers Beschreibungen der Virulenz des Bazillus und der pathologisch-anatomischen Veränderungen, die er veranlaßt, im wesentlichen mit Weinberg u. Séguins Beschreibungen übereinstimmen, scheint kaum ein Grund vorzuliegen, Novys Bazillus und den Bac. oedematiens als 2 verschiedene Formen zu betrachten.

Während Novys Bazillus, wie erwähnt, bei Menschen in mehreren Fällen als spontane Ursache des Gasbrandes nachgewiesen wurde, ist dies meines Wissens nur in 3 Fällen bei Tieren der Fall gewesen: Kerrys Stamm aus einem Ochsen, v. Hiblers Stamm 3 aus einem Wildschwein und 1 von M. Christiansen (mündliche Mitteilung) bei einem Pferde nachgewiesener Fall von „malignem Oedem". Der unten beschriebene Befund scheint mir daher von gewissem Interesse zu sein.

Am 23. 7. 1924 kam in „Københavns Flæskehal" ein Schlächtereischwein von etwa 75 kg an. Die makroskopische Untersuchung ergab eine etwa $^3/_4$ m lange, sehr hervorragende Phlegmone, die sich von der linken Backe weit über den Hals und Bug hinab erstreckte. Die Haut war blaurot und von teigartiger Konsistenz, aber intakt. An Einschnitten war hämorrhagisches, dunkelrotes Gewebe mit stellenweisen Nekrosen in der Muskulatur ersichtlich. Es fanden sich außerdem etliche Luftblasen, in überwiegendem Maße aber ein hämorrhagisches und in der Peripherie der Phlegmone nur schwach rotfarbiges, gelatinöses Oedem. Auch die Speckschicht war von den Veränderungen befallen. Die Mikroskopie ergab im Oedem zahlreiche, grampositive, ziemlich lange (bis etwa 8 μ) und kürzere, plumpe Stäbchen mit abgerundeten Enden. Einzelne der Bazillen ergaben sich als sehr wenig gramfest. Die Stäbchen lagen meist vereinzelt im Oedem, ab und zu 2 und 2 zusammen; Ketten wurden nicht nachgewiesen. Nur vereinzelte der Bazillen trugen länglich-ovale, sehr große Sporen an der Mitte oder den Enden. Oft fanden sich schwach gebogene Stäbchen, ab und zu ein C bildend. Die Bazillen waren anscheinend in Reinkultur vorhanden; die Kulturversuche ergaben aber, daß sich in dem veränderten Gewebe sowohl Kokken als Streptokokken befanden.

Nachdem teils „Rohkulturen" in v. Hiblers Hirnsubstrat angelegt worden waren und teils Verteilung ad modum Liborius in $^1/_2$proz. Dextrose-Agar stattgefunden hatte, wurde eine Reihe von Untersuchungen angestellt, um den Platz des Bazillus im System zu bestimmen.

Der Bazillus im tierischen Körper: Die Untersuchungen wurden ausgeführt teils nach Verimpfung von Originalmaterial an Meerschweinchen, Kaninchen und weißen Mäusen und teils mit Reinkulturen in Hirnsubstrat und betreffen die Bestimmung der Beweglichkeit des Bazillus, die Wachstumsweise in Oedemflüssigkeit und auf serösen Häutchen, die Zilienbildung, die Granuloseeinlagerungen im Bazillenkörper und die Sporenbildung.

In hängenden Tropfen, der Oedemflüssigkeit direkt entnom-

men, wiesen die Bazillen keine oder nur eine geringe Beweglichkeit auf. Bei Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung wurden die Bewegungen aber deutlich, so daß nicht nur von einer Entfernung vom Orte, sondern auch von schwachen, gebuchteten Bewegungen des Bazillenkörpers selbst die Rede war. Es gelang nicht, in Bazillen aus Oedemflüssigkeit oder an der Serosa Zilien oder deutliche Granulosekörner nachzuweisen. In der Oedemflüssigkeit fanden sich die Stäbchen in der Regel vereinzelt, öfters jedoch 2 und 2 zusammen; dagegen bildeten sich nie Ketten.

In Abdruckpräparaten aus der Leberoberfläche wurden die Bazillen ständig vereinzelt lagernd nachgewiesen. So wurden in zahlreichen Präparaten nie mehr als höchstens 3 Stäbchen im Zusammenhang nachgewiesen.

Die Größe war eine ziemlich schwankende; es fanden sich sehr große, dralle Bazillen und öfters Stäbchen, die nur halb so groß (3—4 μ) waren. Wenn die Untersuchungen unmittelbar nach dem Tode des Versuchstiers stattfanden, wurden sehr selten Sporen nachgewiesen, die dann in der Regel in Präparaten auftraten, die direkt an der Impfstelle entnommen waren. Wenn die Tiere vor der Sektion 24 Std. gelegen hatten, so fanden sich ab und zu Sporen. Diese waren meist länglich-oval (es kamen jedoch auch mehr kugelrunde Formen vor) und lagen sowohl mitten am Bazillenkörper wie an den Enden. Die sporentragenden Stäbchen schienen oft sehr wenig gramfest. In Abdruckpräparaten aus der Serosa wurden keine sporentragenden Bazillen nachgewiesen.

Kolonieformen. Bei Verteilung in hohen Schichten in Dextroseagar ($^1/_2$proz. Dextrose) entstanden nach etwa 24 Std. unregelmäßige, mit zahlreichen gebuchteten Ausläufern versehene, sozusagen watteähnliche Kolonien. Einige Kolonien waren dichter (dunkler) als die anderen, hatten aber immer fadenartige Struktur. Die Größe betrug nach etwa 48 Std. ca. 1 mm im Durchmesser. Der Nährboden wurde nach und nach durch Luftblasen gesprengt.

Oberflächenkolonien auf $^1/_2$proz. Dextroseagar. Kultur unter Pyrogallol. Im Laufe von 2—4mal 24 Std. entstanden kleine graublaue, schwach gewölbte Kolonien von ab und zu unregelmäßiger Kontur; dagegen wurden nie Ausläufer nachgewiesen.

Auf 20 Proz. Ziegenblut und 2 Proz. Dextrose enthaltendem Agar wiesen die Kolonien einen ähnlichen Bau auf. Im Laufe von 24—48 Std. zeigte sich eine kräftige Hämolyse des Blutes.

Oxo-Gelatine mit 1 Proz. Dextrose. Kultur in hohen Schichten. Das Wachstum war bei etwa 24° C ein sehr geringes; erst nach 4—6mal 24 Std. entstanden kleine, makroskopisch kaum sichtbare, unregelmäßige Kolonien mit zahlreichen Ausläufern; diese waren ab und zu radiär angeordnet. Es entstand sogar bei langem Stehenlassen nur eine sehr geringe (oft nur mikroskopisch sichtbare), konzentrische Schmelzung um die Kolonien, und zwar nicht um alle. Der Bazillus war augenscheinlich imstande, Gelatine zu schmelzen, was aber bei der niedrigen Temperatur nur sehr langsam vonstatten ging. Es fanden sich außerdem Luftblasen im Nährboden.

Das Wachstum in verschiedenen Substraten: In gewöhnlicher zuckerfreier Oxo-Bouillon war das Wachstum gering oder blieb ganz aus. Bei Zusatz von $^1/_2$ Proz. Dextrose ergab sich im Laufe weniger Stunden ein kräftiges, diffuses Wachstum mit Ent-

wicklung von Gas. Im Laufe von etwa 20 Std. bildete sich ein großer, lockerer Niederschlag mit klarer Flüssigkeit darüber. Die Reaktion war stark sauer, und die Kulturen hatten denn auch einen säuerlichen Geruch. Auch in Bouillon mit etwa 10 Proz. Pferdeserum wuchsen die Bakterien gut, und zwar ähnlich wie in Dextrosebouillon, jedoch fehlte die starke Gasentwicklung. Es ergab sich jedoch immer einige Gasentwicklung, möglicherweise durch Spaltung von Eiweiß. Milch gerann im Laufe von 24—48 Std. Das Gerinnsel war groß und zusammenhängend, hie und da von Luftblasen durchsetzt und in ein wenig trübem Molken gelegen. Eine Auflösung des Gerinnsels war nicht nachzuweisen.

Schrägkulturen auf Pferdeserum-Agar (etwa 10proz. Serum) bildete im Laufe einiger Tage eine dünne, glänzende, fettige Wachstumsmembran. In v. Hiblers Hirnsubstrat wuchsen die Bazillen ausgezeichnet, ohne das Substrat zu schwärzen und mit Gasentwicklung. Nach einigen Tagen war das Substrat gegenüber Lackmus deutlich sauer. Der Bazillus gehörte somit zu v. Hiblers erster Gruppe von Anaërobionten.

Saccharolytische Fähigkeiten: Verschiedene Zuckerarten wurden in zuckerfreier Lackmus-Oxo-Bouillon von $^1/_2$ Proz. Stärke gelöst, und die Lösungen wurden danach in doppelte Gärungsreagenzgläser gefüllt. Nach $^1/_4$stünd. Kochen und darauffolgendem schnellen Abkühlen wurden die Gläser mit einer frischen Hirnsubstratkultur besät. Die Kultur fand danach unter Pyrogallol statt. Sobald Wachstum eintrat (was im Laufe von 24—48 Std. der Fall war), verschwand die blaue Lackmusfarbe. Diese Farbe oder — in Fällen einer Vergärung — die rote Farbe kehrte schnell zurück, wenn die Luft wieder Zutritt hatte. Nach etwa 10tägigem Stehen im Thermostaten wurden die Gläser untersucht. Dabei zeigte es sich, daß der Bazillus imstande war, bei Gas- und Säureentwicklung Dextrose, Maltose und Fruktose, nicht aber Galaktose, Mannose, Laktose, Saccharose, Raffinose, Glyzerin, Glykogen, Arabinose, Rhamnose, Dulzit, Adonit und Mannit zu vergären. Er besaß also im Verhältnis zu den meisten übrigen „Oedembazillen" ein sehr wenig umfassendes Vergärungsvermögen. In sämtlichen Gläsern mit nicht vergärten Zuckerarten wurde eine kleine Luftblase nachgewiesen. Die Gasentwicklung war bei den vergärten Kohlehydraten meist sehr groß, bis $^3/_4$ der Vergärungsröhre, war aber bei Umprüfungen ziemlich schwankend.

Weinberg u. Séguin (1918) geben (nach H. Henry) an, daß 2 untersuchte Stämme des Bac. oedematiens Dextrose, Lävulose und Maltose vergären. 1919 veröffentlichte das vom „Medical Research Committee" eingesetzte „Committee upon Anaerobic Bacteria and Infections" umfassende Mitteilungen über gasbranderzeugende Bakterien. Es wird darin vom Bac. oedematiens u. a. angegeben, daß er Glukose, Lävulose und Maltose, nicht aber Glyzerin, Galaktose, Saccharose, Laktose, Mannit, Dulzit, Inulin oder Salizin zu spalten vermochte. Eine Originalkultur des Bac. oedematiens (von Weinberg u. Seguin), die ich gleichzeitig mit dem isolierten Bazillus vergärte, verhielt sich ganz wie dieser.

Der Bazillus in den verschiedenen Substraten: Die Bazillen verhielten sich in den geprüften künstlichen Substraten einigermaßen gleichmäßig; jedoch wurde eine sehr schwankende Form und

Größe beobachtet, wie auch immer, namentlich in älteren Kulturen, viele gramnegative Stäbchen auftraten. Nur auf Serumagar und teilweise in Serumbouillon gaben sich entschiedene Abweichungen von Formen in anderen Substraten zu erkennen, indem die Bazillen in jenen, und zwar namentlich auf Serumagar, eine größere Neigung zur Ketten- und Sporenbildung aufwiesen. So wurden Ketten von bis 10 Individuen sowie einzelne lange Fadenbazillen nachgewiesen, also ähnliche Verhältnisse, wie sie M. Christiansen (1919) bei Fraenkels Bazillus gefunden hat.

Die Sporenbildung war, wenn auch keine reichliche, so doch ausgeprägt stärker in Serumsubstraten. In den übrigen Substraten wurden nur gelegentlich Sporen, nie aber Ketten nachgewiesen. Bei Zusatz von 1 Proz. Soda ergab sich lebhafte Sporenbildung. Durch diese Eigentümlichkeit wurde es ermöglicht, sich Reinkulturen direkt aus Oedemflüssigkeiten im Originalmaterial und aus den Versuchstieren zu verschaffen, indem man für eine Rohkultur in alkalisiertem Hirnsubstrat sorgte und die Kultur darauf etwa $^1/_2$ Std. bei 90° C pasteurisierte. Die gebildeten Sporen widerstanden leicht dieser Erwärmung, ohne an Wachstumsenergie zu verlieren. In einzelnen Bazillen, namentlich aus Dextrosebouillonkulturen, wurden kleine, vereinzelt gelegene Granulosekörner nachgewiesen; mehr oder minder blasenartige Formen wurden ab und zu beobachtet in Präparaten aus zuckerhaltigen Kulturen. In frischen Dextrose-Agarkulturen wurden bei Pepplers Färbeverfahren zahlreiche peritrich angeordnete Zilien, wie auch öfters freiliegende Riesenzellen vorgefunden.

Serologie: Mit einem dem Bac. oedematiens (Weinberg u. Séguin) entsprechenden Serum ergab sich totale Agglutination sogar in Verdünnungen von 1—30000 in einer wenige Stunden alten, $^1/_4$proz. Dextrose-Bouillonkultur. Autoagglutination trat sehr schnell ein, so daß man die Titergrenze kaum genau bestimmen konnte. Der Titer des angewandten Serums ließ sich aus demselben Grunde nicht mit Sicherheit bestimmen. Dieser Probe ist daher kaum eine maßgebende Bedeutung beizulegen.

Pathogenität: Bei subkutaner Verimpfung von 0,1—0,2 ccm frischer Hirnkultur auf Meerschweinchen (Gewicht etwa 300 g) wurden diese im Laufe von 24—48 Std. getötet. Die Sektion ergab ein ausgebreitetes, hämorrhagisches, gelatinöses Oedem an der Impfstelle (am Processus xiphoideus) längs Bauch und Brust, unter die Schulterpartien und ganz auf den Rücken herum. An der Peripherie der Phlegmone fand sich schwach blutfarbiges Oedem, dagegen sehr wenig oder gar kein Gas.

Kaninchen und weiße Mäuse reagierten in ähnlicher Weise; bei letzteren war das gasfreie, schwach blutfarbige Oedem ausgesprochener als bei Meerschweinchen und Kaninchen.

Der Bazillus ist meiner Meinung nach somit als dem Novyschen Bazillus (Bac. oedematiens Weinberg u. Séguin) sehr nahestehend zu betrachten. Eine Originalkultur des Bac. oedematiens (von Weinberg u. Séguin) verhielt sich in der Tat auch ungefähr in derselben Weise, jedoch waren gewisse Unterschiede nachzuweisen: So wuchs die geprüfte Originalkultur etwas schwieriger in künstlichen Substraten, und die Kolonien hatten in Dextroseagar durchgehends längere Ausläufer. In frischer Dextrosebouillon wuchs der Bac. oedematiens ab und zu in Form von Ketten von 3—4 Ge-

lenken, was bei dem isolierten Bazillus nicht vorkam, während umgekehrt beim Bac. oedematiens auf Serumagar weder Ketten noch Fäden nachgewiesen wurden (es wurde jedoch nur ein einzelner Versuch angestellt). Ein mehr in die Augen springender Unterschied wurde bei den pathologisch-anatomischen Veränderungen nachgewiesen. So fand sich bei Infektionen mit der Originalkultur so gut wie immer ein farbloses gelatinöses Oedem, während der von mir isolierte Bazillus in weit höherem Maße hämorrhagische Oedeme hervorrief.

Im tierischen Körper fand sich immer nur eine sehr geringe Anzahl von Bac. oedematiens, bei Infektionen mit dem isolierten Bazillus aber eine sehr große Anzahl. Ferner war die Sporenbildung beim Bac. oedematiens eine schnellere. Möglicherweise beruhen diese Verschiedenheiten nur auf dem Altersunterschied.

Benutzte Literatur.

Christiansen, M., Bacillus phlegmones emphysematosae (Fraenkel), (Welch-Fraenkels Bacil) og dens Forekomst ved den spontane Forraadnelse. (Meddel. fra den kgl. Veterinær- og Landbohøjskol. Serumlaborat. 59. (Bibliotek for Læger). 1919. København. — Costa et Troisier, Syndrome mortel d'oedème gazeux dans une blessure de guerre, provoqué par le „Bacille neïgeux". (Compt. rend. Soc. Biol. T. 78. 1915. p. 354. — Dalyell, E. J., A case of gas gangrene associated with Bac. oedematiens. (Brit. med. Journ. Vol. 1. London 1917. p. 361. — Kerry, Ueber einen neuen pathogenen anaëroben Bazillus. (Oesterr. Ztschr. f. wissensch. Veterinärk. Bd. 5. 1894. H. 2 u. 3.) — Kruse, siehe Flügge Die Mikroorganismen. 3. Aufl. Bd. 2. 1896. S. 242. — Legros, G., Un cas de gangrène gazeuse. Association du B. perfringens et du B. oedematiens. (Presse méd. T. 25. 1917. p. 101.) — Medical Research Committee (Chairman: Waldor Astor), The classification and study of the anaerobic bacteria of war wounds with supplement methods of cultivating anaerobic bacteria. (National Health Insurance. Special Report. Ser. No. 12. London 1917.) — Medical Research Committee (Chairman: Waldor Astor), Reports of the committee upon anaerobic bacteria and infections. (The committee upon anaerobic bacteria and infections. Chairman: William Bulloch: Report on the anaerobic infections of wounds and the bacteriological and serological problems arising therefrom.) (National Health Insurance. Special Report Ser. No. 39. London 1919.) — Novy, Ein neuer anaërober Bazillus des malignen Oedemes. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 17. 1894. S. 210.) — Vaucher, Le B. oedematiens dans un cas de gangrène gazeuse. (Compt. Rend. Soc. de Biol. T. 80. 1917. p. 251.) — Weinberg, M., et Séguin, P., La gangrène gazeuse. Bacteriologie. Reproduction expérimentale. Serothérapie. Paris (Masson) 1918. — Hibler, E. v., Untersuchungen über die pathogenen Anaëroben. Jena (G. Fischer) 1908.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über die Technik der Anaërobenzüchtung.

I. Mitteilung[1]).

[Aus der II. Med. Univ.-Klinik in Wien (Vorstand: Prof. N. Ortner).]

Von **Nikolaus Kovács.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Die systematischen Arbeiten der letzten Zeit, die eine genaue Differenzierung der anaëroben Bakterien ermöglichen, besonders die Aus-

1) Nach einem Demonstrationsvortrag, gehalten in der Dez.-Sitzung d. Vereinigung d. path. Anatomen Wiens.

arbeitung der Identifizierung derselben nach der Kulturform (Zeißler) haben neue Aussichten zur Erfassung ihres Vorkommens, ihrer biologischen Funktion im allgemeinen, besonders aber im menschlichen und tierischen Organismus gezeigt. Kämmerer u. Miller (5), Passini u. Czaczkes (10) wiesen neuerlich auf die Bedeutung der Anaëroben als lebenswichtige Saprophyten hin. Der Darm, auch der menschliche, bildet die optimalste Brutstätte für die Anaëroben, woselbst auch nach den Forschungen der letzten Zeit der Ort ihres häufigsten Vorkommens und damit auch die Quelle sonstiger Medien, wo die Anaëroben eine pathogene Rolle spielen, zu suchen ist. Ich will nur auf die Rolle der bearbeiteten Erde in der Verbreitung der Anaërobeninfektionen bei Verletzungen hinweisen; so erklärt sich das häufige Vorkommen von Tetanus in manchen Städten durch die reichliche Verwendung von Lasttieren in diesen Gegenden.

Es ist von besonderer Bedeutung, sich mit der normalen biologischen Funktion dieser Bakterien zu beschäftigen: mit ihrer Rolle bei der Verdauung bzw. mit ihrer Dysfunktion, und den aus diesen resultierenden Ausfallserscheinungen usw. Zur Klärung dieser Fragen sind an unserer Klinik von Luger und mir ausgedehnte Untersuchungen im Gange, zu welchen die Arbeiten Lugers (9) über die pathologische Bedeutung der Darmspirochäten und Fusiformen den ersten Beitrag bedeuteten. Diese Arbeiten sollen andernorts ausführlich besprochen werden, der Zweck dieser Zeilen soll die Publikation einiger technischer Neuerungen sein, die sich während der erwähnten Untersuchungen als praktisch erwiesen haben.

Bei den Arbeiten mit Anaëroben gewinnt die morphologische Differenzierung nach der Kulturform an Bedeutung (Zeißler, 11), womit aber der Gebrauch anderweitiger Differentialmittel, hauptsächlich der sog. „bunten Reihe", nicht vollständig eliminiert werden soll. In meiner Arbeit über den Pepton-Gelatinenährboden (7) zur Differenzierung der Anaëroben konnte ich auf die Vorteile der Verwendung von hochkonzentrierten Eiweißnährböden (Pepton-Traubenzuckerbouillon) zur Züchtung der Anaëroben hinweisen.

Es spielt aber nicht nur in den hochkonzentrierten Peptonnährböden, sondern auch bei den gewöhnlichen Agarnährböden, so bei der Dimethyl-p-phenylendiamin bzw. Traubenzuckeragar der Gebrauch von entsprechenden Eiweißlösungen eine wesentliche Rolle. Zeißler (11) warnt vor der Benützung von Ersatznährböden zur Herstellung des Bluttraubenzuckeragars. Bei meinen Untersuchungen konnte ich sehen, daß Stämme von verschiedenen anaëroben Bakterien, die in Stichkulturen von Dimethyl-p-phenilendiamin (6) oder Traubenzuckeragar nach der üblichen Vorschrift zubereitet (Bouillon aus 1 Teil Fleisch und 2 Teilen Wasser) gut wuchsen, in dem entsprechenden Nährboden mit Pankreatin-Soda, nach Hottinger (4) hergestellt, ein weit schlechteres oder überhaupt kein Wachstum zeigten. Es ist notwendig, bei der Anaërobenzüchtung immer darauf zu achten, daß ein bestimmtes Quantum Eiweiß in dem Nährboden vorhanden ist, bei welchem aber zugleich die Qualität der Eiweißstoffe maßgebend ist, da die stärker abgebauten Peptone, wie ich bezüglich des Merckschen Peptons zeigen konnte (7), das Wachstum der Anaëroben viel weniger fördert als die hochmolekularen Peptone, z. B. das Witte-Pepton. Daher glaube ich raten zu können, nicht nur bei der Herstellung der Traubenzuckerblutagarplatte, sondern überhaupt bei der Anaëroben-

züchtung bei der Auswahl der zu den Nährböden verwendeten Bouillon mit der größten Vorsicht vorzugehen.

Weitere Untersuchungen stellte ich mit einem der wichtigsten Differentialnährböden, mit dem Gehirnbrei, an. Praktische Bedeutung kann in der Technik der Anaërobenzüchtung nur eine Methode erreichen, welche eine rasche und einfache Differenzierung derselben ermöglicht. Die Bedeutung, die der Gehirnbrei nach Hibler (3) besitzt, glaube ich nicht ausführlicher schildern zu müssen. Man muß sich aber darüber klar sein, daß dieser Differentialnährboden einen gewissen Nachteil besitzt, nämlich den, daß immer einige Tage vergehen, bis es möglich ist, ein sicheres Urteil über Schwärzung oder Rosafärbung zu gewinnen. Nach Zeißler (11) muß man die Kulturen der Gehirnbrei schwärzenden Anaëroben bis zum deutlichen Eintritt der Schwärzung, meistens 3—8 Tage bei 37°, bebrüten; ich suchte daher, nachdem diese Methode bei Aufarbeitung eines großen Anaërobenmaterials immer mit einem Zeitverluste verbunden ist, nach einer Sensibilisierung des Nährbodens.

Ausgehend von der Tatsache, daß Gehirnbreischwärzung auf einer Fällung des Organeisens durch den gebildeten Schwefelwasserstoff bei alkalischer Reaktion beruht, gab ich zu dem Gehirnbrei Ferrosulfat ($FeSO_4$), welches, wie wir aus den Arbeiten von Hata wissen, eine Reduktionswirkung sowie eine fördernde Wirkung auf das Anaërobenwachstum besitzt. Hata (2) verwendete Eisensulfat in einer 0.1—0,5proz. Konzentration. Ich stellte mir auf Grund dieser Versuche Gehirnnährböden mit verschiedenen Eisensulfatkonzentrationen her (Tabelle I). In allen Konzentrationen konnte ich eine starke

Tabelle I.

B. putrificus verrucosus Stamm 85.

2 T. Gehirn + 1 T. $FeSO_4$ Proz.	0,5 Proz.	0,3 Proz.	0,2 Proz.	0,1 Proz.	0,05 Proz.	Norm. Gehirnbrei
nach 24 Std.	±	±	+	+	+	—
„ 48 „	+	+	++	++	++	±

Förderung des chemischen Vorganges und der mit diesem verbundenen Farbenreaktion konstatieren. Als optimalste Konzentration erwies sich eine solche von 2 Teilen Gehirn und 1 Teil 0,05proz. Eisensulfatlösung. Ich konnte in diesem Nährboden deutliche Schwärzung im allgemeinen 24—48 Std. früher als im normalen Gehirnbrei nachweisen, wobei die Reaktion nicht nur als Grauung bzw. Grauschwärzung, wie es bei letzterem der Fall ist, auftritt, sondern als exquisite Schwärzung, welche schon ungefähr 24 Std. nach dem anfänglichen Farbenumschlag in eine tiefschwarze Verfärbung übergeht.

Die Herstellung des Nährbodens geschieht ähnlich wie die des gewöhnlichen Hirnbreies: 2 Teile Gehirn von Kalb, Rind oder Menschen werden von der Pia und den Gefäßen sorgfältig befreit, mit Wasser ausgewaschen und mit 1 Teil — zur Vermeidung der Entstehung von Ferrisalzen durch das Kochen — in der Kälte hergestellten 0,05proz. Ferrosulfatlösung vermischt, durch Gaze oder Drahtsieb passiert, schließlich in Eprouvetten oder Kolben abgefüllt. Die Sterilisierung erfolgt auf Vorschlag von Zeißler nach Aufkochen im Dampftopf zur Vertreibung der Luft 2 Std. lang im Autoklaven bei 110°.

Der Eisensulfatgehirnbrei hat eine ähnliche Farbe wie der gewöhnliche Gehirnbrei, nur zeigt er einen ganz leichten Stich ins Graue, welche Farbe aber bei eventueller Benützung höherer Konzentrationen von Eisensulfat viel ausgesprochener ist. Die leicht graue Farbennuance hat aber den Vorteil, daß bei den nichtschwärzenden Arten der am unteren Teil der Eprouvette anfangende Rosaumschlag des Nährbodens viel eklatanter wird als bei Gebrauch des gewöhnlichen Gehirnbreies, so daß die negative Diagnose der nicht schwärzenden Arten durch diesen deutlichen Farbenkontrast die Ablesung wesentlich erleichtert.

Der Eisensulfatgehirnbrei hat gegenüber dem normalen Gehirnbrei die Eigenschaft, daß er durch die Stämme des Bac. phlegmonis emphysematosae leicht grau verfärbt wird. Dieser Umstand wäre vielleicht in der Weise zu erklären, daß die Gasbrandbazillen im Gehirnbrei weniger Säure bilden dürften als die anderen nicht schwärzenden Arten, so daß möglicherweise ein sehr stark gehemmter Ablauf der Schwefeleisenfällung stattfindet. Versuche, die diese Frage klären sollen, sind noch im Gange. Die leichte Graufärbung der Gasbrandstämme ist ohne weiteres von der Schwärzung der B. sporogenes Metschnikoff abzugrenzen, nachdem dieser in dem Eisensulfatgehirnbrei mit schwarzem Farbenumschlag wächst, der gegenüber den anderen schwärzenden Stämmen im allgemeinen mehr am oberen Nährbodenteil lokalisiert ist. Ich möchte aber aus der „Halbschwärzung" des B. sporogenes Metschnikoff keine weitgehenden diagnostischen Schlüsse ziehen, nachdem auch bei den sonstigen schwärzenden Arten oft Stämme zu finden sind, die ihren „charakteristischen" biologischen Funktionen nicht so prompt entsprechen, als die Mehrzahl der Stämme derselben Art, ohne daß in diesem Verhalten ein Grund für eine anderswärtige Einteilung bestünde, eine Erscheinung, die bei manchen aëroben Bakterien häufig zu beobachten ist; so finden wir z. B. bei der Typhusgruppe in der Mehrproduktion an Säure in der Lackmusmolke durch den B. typhi noch keinen Grund für eine Einteilung in eine andere Art.

Der Eisensulfatgehirnbrei hat außerdem noch gegenüber dem Normalgehirnbrei den Vorteil, daß die Anaëroben durch die wachstumsfördernde Wirkung des Eisensulfates in diesem Nährboden schneller und intensiver wachsen, was aus der lebhaften Gasbildung ersichtlich ist, welche oft so kräftig ist, daß der ganze Brei in starkes Schäumen gerät, ein Phänomen, welches sich bei manchen Anaërobenstämmen, allerdings hauptsächlich in den obersten Schichten, auch im normalen Gehirnbrei, jedoch in viel schwächerem Grade, abspielt.

Es gelang nicht eine Förderung der Gehirnbreischwärzung durch andere reduzierende Stoffe, so Dimethyl-p-phenylendiamin, Traubenzucker, ameisensaures oder indigschwefelsaures Natrium zu erzielen, es scheint sogar, daß solche Zusätze eine Hemmung der Farbenreaktion zur Folge haben, beim Traubenzucker wahrscheinlich infolge der Veränderung der Reaktion.

Nachdem die Gehirnbreischwärzung, bzw. Rosafärbung einfach als eine Manifestation des Stoffwechsels der Anaëroben zu erklären ist, war es von vornherein wahrscheinlich, daß dieselbe von der Größe der zu der Beimpfung verwendeten Quantität der Bakterien abhängt. In den diesbezüglichen Versuchen konnte ich eine deutliche Beschleunigung der Reaktion bei der Impfung mit der Pipette aus Kulturen von flüssigen Nährböden erzielen (Tabelle II). Es ist jedoch nicht ratsam.

Tabelle II.

B. botulinus Stamm 35.

Trofenzahl der Kultur	1	3	5	10
nach 24 Std.	+	+	++	++
„ 48 „	++	++	+++	+++

über eine bestimmte Tropfenzahl der zur Beimpfung verwendeten Kulturen hinauszugehen, nachdem man dadurch immer der Gefahr ausgesetzt wird, daß die Reaktion des Gehirnbreies von vornherein verändert wird. Es erwies sich die Verwendung von 5—10 Tropfen (bis 0,5 ccm) Kultur z. B. aus einer 10proz. Peptontraubenzuckerbouillon zu einer Eprouvette Eisensulfatgehirnbreinährboden als praktische und äußerst schnelle Methode zur Differenzierung der anaëroben Bakterien.

Weiter möchte ich einen einfachen und billigen Anaërobenexsikkator beschreiben. Der heute am meisten gebrauchte Maaßensche Exsikkator hat den Nachteil, daß er durch seine Höhe nur in der Brutkammer benützbar ist. Es gibt zwar noch ein kleineres Format, welches aber selten gebraucht wird, doch besitzt auch dieses ohne Hahn eine Höhe von 30 cm, so daß auch dieser Exsikkator in den meisten Brutöfen, die ebenfalls eine Höhe von 30 cm haben, nicht verwendbar ist. Der Maaßensche Apparat hat außerdem mehrere andere Nachteile. Als ein großer Fehler des Apparates muß der Umstand bezeichnet werden, daß der Exsikkator einen sehr großen unausgenützten Raum besitzt; der obere Teil des Exsikkators ist ungefähr ebenso hoch wie der praktisch ausgenützte untere Teil, so daß dieser obere Raum, welcher für das Pyrogallol-Kalilaugegemisch verwendet wird, fast so viel Platz einnimmt, als der zu Züchtungszwecken verwendete. Dabei muß bemerkt werden, daß durch den Aufbau des Oberteiles für die Pyrogallol-Kalilauge eigentlich ein relativ kleiner Raum verwendet wird und der ganze übrige Teil als toter Raum funktioniert. Dieser Umstand ist nicht ohne Bedeutung, nachdem aus dem Apparat die Luft evakuiert und der Restsauerstoff noch mit Pyrogallol eliminiert werden soll. Was die Größe der Anaërobenexsikkatoren betrifft, glaube ich mich nicht zu irren, wenn ich annehme, daß man eher den praktischen Bedürfnissen entspricht, wenn man Exsikkatoren für weniger Petri-Schalen und kleinerem Kulturraum konstruiert, wodurch auch wesentlich weniger von dem teuren Pyrogallol gebraucht wird. Es ist ja nicht das Anlegen von großen Reihenversuchen zu morphologischen und andersartigen Studien der Hauptzweck der Anaërobenzüchtung in den bakteriologischen Laboratorien und Prosekturen, sondern die möglichst einfache Reinzüchtung und Differenzierung der anaëroben Bakterien, und daher genügen zu diesem Zwecke die etwas kleineren Exsikkatoren. Ich glaube, es ist günstiger, jene Fälle, wo mehrere verschiedenartige Versuche mit Anaëroben ausgeführt werden, diese in mehreren kleineren Exsikkatoren je nach der gleichen Versuchsanordnung zu züchten — einige kleinere Exsikkatoren kosten ungefähr das gleiche wie ein Apparat nach dem alten System — wodurch auch vermieden wird, daß Versuche, die noch nicht abgeschlossen sind, dem Einfluß des Luftsauerstoffes ausgesetzt werden und dann erst wieder im Vakuum bebrütet werden sollen. Es ist nicht gleichgültig, wenn die

Anaëroben während der Versuchsdauer den ungünstigen Einwirkungen des Luftsauerstoffes ausgesetzt werden.

Die bisher übliche Schiefstellung des Apparates zur Verhinderung der vorzeitigen Einwirkung der Lauge auf das Pyrogallol muß als etwas umständlich bezeichnet werden. Das Pyrogallol muß erstens zur Verhinderung des Herunterfallens in den Deckelteil des Exsikkators mit Wattebauschen befestigt werden, zweitens erfordert das Hineingießen der Lauge in den Deckelteil und das nachfolgende Aufsetzen des Deckels eine besondere Sorgfalt, damit die Lauge nach erfolgter Evakuierung mit dem Pyrogallol in Berührung kommt. Es mag wohl der Fall sein, daß dem Geübten diese Methode keine Schwierigkeiten macht, sie ist jedoch umständlich und daher für den Mindergeübten nicht sehr empfehlenswert.

Die Verwendung des in letzter Zeit von Brekenfeld (1) empfohlenen Anaërobenapparates aus Weckglas, wobei die Verunreinigung des Pyrogallols mit Kalilauge durch Einwicklung des ersteren in ein Blockpapier verzögert werden soll, halte ich nicht für ganz zweckmäßig. Nehmen wir den Fall an, daß die Vakuumpumpe nicht tadellos funktioniert, und längere Zeit, z. B. 10—15 Min. zur Evakuierung braucht, so tritt die Vereinigung der Pyrogallol-Kalilauge, auch wenn ein dickeres Papier verwendet wurde, vorzeitig ein. Ein anderes wichtigeres Moment ist aber im Wegfall der Kontrollierbarkeit des Vakuums zu suchen. Es ist zwar bei der Benützung der Bluttraubenzuckeragarplatten die Farbe des Nährbodens teilweise eine Kontrolle des Vakuums, jedoch ist die Farbe des Pyrogallol-Kalilaugegemisches ein viel wichtigerer Indikator. Das Gemisch hat in einer unten zu beschreibenden Konzentration bei einem Vakuum von ca. über 740 mm Hg, wobei ein Exsikkator-Rauminhalt von ungefähr 2 Liter benützt wird, eine hellbraune Farbe. Diese nimmt bei Zutritt von Sauerstoff ein charakteristisches dunkelschwarzbraunes Kolorit an. Dieser Farbenwechsel bildet in der Regel eine genügende Kontrolle des Vakuums. Es hat sich aber bei unseren Versuchen außerdem die Kontrolle des Vakuums vor dem Aufmachen des Apparates zur Prüfung des Grades der Luftverdünnung außerordentlich bewährt. Es sei daß der Exsikkator ausnahmsweise nicht ganz tadellos funktioniert und etwas Luft während der Bebrütung doch in den Apparat gelangt, was dann an dem Pyrogallolgemisch nicht ganz mit Sicherheit wahrnehmbar wird, wodurch selbstverständlich ganz andere Versuchsresultate erzielt werden, wie bei einem kompletten Vakuum. Der Züchtungseffekt ist bei der Kontrolle des Vakuums durch Ansetzen des Apparates an den Manometer der in Funktion befindlichen Luftpumpe ganz anders zu verwerten, als wenn die Möglichkeit besteht, daß die Anaëroben durch technische Fehler überhaupt nicht oder schlecht zur Entwicklung gelangen. Die letzterwähnte Kontrolle ist bei Benützung von Saugdüsen nicht ausführbar. Die Verwendung von Manometern in den Exsikkatoren würde wieder eine größere Verteuerung der Arbeiten mit Anaëroben bedeuten. Zum Schlusse glaube ich, daß das Arbeiten mit Glashähnen viel einfacher ist, als dies bei dem Gebrauch von Saugdüsen der Fall ist.

Ich konstruierte einen Anaërobenexsikkator auf Grund des Prinzips der Kombination der Pyrogallolmethode mit der Züchtung im luftverdünnten Raum, welcher die vorher beschriebenen Fehler vermeiden soll. Der Apparat (siehe Abbildung) besteht aus einem 21 cm hohen

Glaszylinder von 13 cm Durchmesser, mit einem Deckel, auf welchem ein Tubus mit einem eingeschliffenen Glashahn sitzt, so daß die Gesamthöhe des Apparates 29 cm ausmacht. Die Petri-Schalen stehen in dem Apparat auf einem einfachen Metallgestell, und zwar so, daß sie aufeinandersitzen und das Gestell nur einen Rahmen zum Herausheben der Schalen bildet. Auf den Petri-Schalen — es haben 8—9 Stück derselben Platz — steht eine gewöhnliche, 3 cm hohe Kristallisierschale für das Pyrogallol (in Pulverform). Der Deckel des Apparates wird mit dem von Zeißler (11) angegebenen gelben Vaselin, ausgelassenem Rindertalg und Toluol āā gut geschmiert und nach ein paarmaligem Drehen um die Längsachse, wodurch das Fett zwischen den Schliffflächen gleichmäßig verteilt wird, die Luft aus dem Exsikkator entfernt. Nach erfolgter Evakuierung wird aus einem Trichter oder Abfüllgefäß durch einen Gummischlauch die Lauge mittels des im Apparat befindlichen Vakuums eingesaugt. Die Biegung der Glasröhre des Glashahnes an dem Exsikkator hat dabei einen doppelten Zweck; der absteigende Ast bezweckt, daß der Apparat durch den Glashahn an seiner Höhe nicht zunimmt, der aufsteigende Ast und der Umstand, daß der Hahn nach oben schaut, hat die Bestimmung, daß bei Ansetzen des Gummischlauches mit der Lauge die Luftbläschen aus dem Hahn automatisch aufsteigen. Der Gummischlauch an dem Trichter mit der Lauge ist am besten aus seinem unteren Teil mit einem zuschraubbaren Quetschhahn verschlossen. Unter dem Quetschhahn soll nur ein so kurzer Schlauchteil vorhanden sein, daß dieser eben auf den Hahn des Apparates daraufschiebbar ist; dann wird der Quetschhahn gelockert und die Lauge fließt in die Röhre des Glashahnes und verdrängt die in diesem befindliche Luft, welche in Bläschenform aus dem Schlauch entweicht. Beim Abfülltrichter mit etwas engerem Ausflußrohr genügt ein einmaliges Zusammendrücken des Gummischlauches, um die in diesem zurückgebliebenen Luftbläschen zu vertreiben. Beim vorsichtigen Aufdrehen des Glashahnes fließt die Lauge auf das in der Kristallisierschale befindliche Pyrogallol. Wenn nur Eprouvetten bebrütet werden, gebe ich auf den in den Apparat hineinreichenden Teil des Glashahnes einen kurzen Gummischlauch, welcher in ein Pulver oder Becherglas oder in eine breite Eprouvette eben hineinragt. Es ist unzweckmäßig, einen längeren Schlauch zu verwenden, da dadurch bei der Evakuierung das Pyrogallol

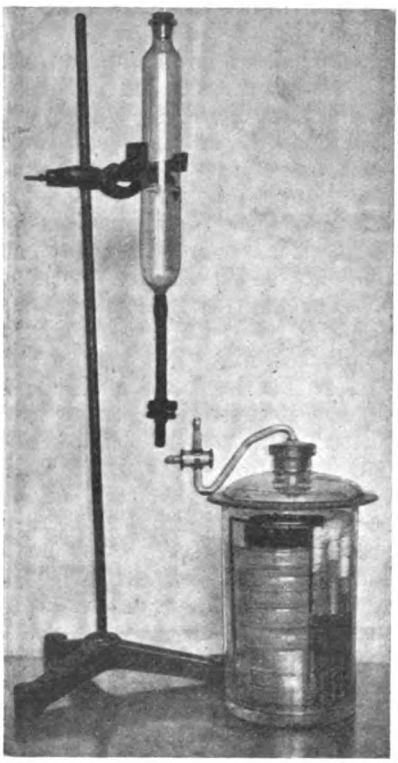


Fig. 1.

auch mitgesaugt wird. Die beschriebene Methode der Vereinigung des Pyrogallos mit der Kalilauge ist viel einfacher als die mit der Schiefstellung des Apparates, auch die Reinigung der Kristallisierschale ist bedeutend leichter als die des Maaßenschen Apparates, bei dem der ganze Oberteil für das Pyrogallol reserviert ist.

Der Apparat, in welchem außer 8—9 Petri-Schalen noch ca. 6 Eprouvetten Platz haben — ich möchte dabei betonen, daß bei dem heutigen Stand der Anaërobentechnik die Bebrütung der flüssigen Nährböden im Vakuum nur zu bestimmten Anlässen notwendig ist und speziell bei Versuchen mit Reinkulturen kaum einen Vorteil bedeutet — entspricht durch seine Größe und Fassungsraum, wie durch die absolute Ausnützung des letzteren, eher dem praktischen Gebrauch als die anderen Apparate. Ich ließ nun für unsere großen Reihenversuche auf Grund des oben beschriebenen Apparates auch große Exsikkatoren für ca. 30 Petri-Schalen herstellen, welche dem Wesen nach aus einem großen Präparatenzylinder und einem zugeschliffenen Exsikkatordeckel mit Hahn bestehen, in welche ich die Vorteile der Laugeneinsaugmethode und die bessere Ausnützung des Fassungsraumes bei der Kultivation ebenfalls vereinigte. Die Apparate kommen aber, wie ich glaube, für den allgemeinen praktischen Gebrauch viel weniger in Betracht, als die oben beschriebenen kleinen Exsikkatoren.

Ich benütze für den Exsikkator ca. 1 g Pyrogallol und 30 ccm 20proz. Kalilauge. Es ist zwar nach Untersuchungen von Liebig (8) 0,2 g Pyrogallol mit 25,0 ccm konz. Kalilauge die optimale Mischung für die Sauerstoffadsorption, eine Mischung, welche 12 ccm Sauerstoff resorbieren kann. Es verursacht aber die Aenderung der Konzentration und der Menge der Lauge praktisch so minimale Differenzen in der Sauerstoffadsorption, daß dieselbe zur Verhinderung der Wasserentziehung und darauffolgender Austrocknung der Platten vernachlässigt werden kann, um so eher, nachdem das Pyrogallol nur als Hilfsmittel zur Entfernung des Restsauerstoffes dient. Größere Mengen von verdünnter Lauge würden einen größeren Raum beanspruchen, was wieder den Bebrütungsraum verringern würde.

Die Oeffnung des Apparates geschieht durch vorsichtiges Aufdrehen des Hahnes, welcher zur Verhinderung der Eintrocknung häufig mit Schweinefett geschmiert werden soll, da sonst die einströmende Luft das Pyrogallol verspritzt. Der Deckel des Exsikkators wird am besten erst nach der Seite verschoben, wodurch das Abheben desselben viel leichter gelingt.

Die guten Züchtungsresultate, die ich mit dem Apparat schon über ein halbes Jahr erzielen konnte, die Billigkeit und die einfache Handhabung des Apparates haben mich veranlaßt, diesen näher zu beschreiben[1]).

Zusammenfassung.

a) Zur Züchtung von anaëroben Bakterien ist bei Gebrauch von Ersatznährböden größte Vorsicht geboten. b) Für den Nachweis der Schwärzung des Gehirnbreies hat sich ein Zusatz von Ferrosulfat als

1) Der Exsikkator ist bei der Firma P. Haack, Wien IX, Garelligasse 4, zu beziehen.

zweckmäßig erwiesen. — c) Der beschriebene Anaërobenexsikkator ermöglicht eine einfachere und praktischere Arbeit als die bisher übliche [1]).

Literatur.

1) Brekenfeld, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. S. 129. — 2) Hata, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 46. S. 539. — 3) Hiebler, Untersuchungen über die pathogenen Anaërobier. Jena (Fischer) 1908. — 4) Hottinger, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 67. S. 178. — 5) Kämmerer u. Miller, Wien. klin. Woch. 1922. S. 639. — 6) Kovács, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. S. 315. — 7) Ders., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. S. 580, — Liebig, zit. n. Treadwell, Kurzes Lehrbuch d. analyt. Chemie. Wien. (Deuticke) 1907. S. 564. — 9) Luger, Arch. f. Verd.-Krankh. Bd. 29. S. 58. — 10) Passini u. Czaczkes, Wien. klin. Woch. 1923. S. 657. — 11) Zeißler, Die Technik der Anaërobenzüchtung. (Kraus-Uhlenhuth, Handb. d. mikrobiol. Technik. Berlin-Wien (Urban u. Schwarzenberg) 1923. S. 961.

1) Nachdem diese Arbeit schon druckfertig war, bekam ich von der Firma Lautenschläger in Berlin einen Kostenvoranschlag mit Abbildung eines, wie ich glaube, bisher noch nicht publizierten, von Zeißler modifizierten Maaßenschen Apparat, welcher eine ähnliche Vorrichtung zum Einsaugen der Lauge enthält.

Inhalt.

Beck, A., u. **Huck, W.,** Enzootische Erkrankungen von Truthühnern und Kanarienvögeln durch Bakterien aus der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie (Paracholera). Mit 2 Abbildungen im Text, S. 330.

Becker, Ueber das angebliche Auftreten unspezifischer Ergebnisse bei der Untersuchung von Tuberkuloseseren mit der Bruckschen Reaktion. Bemerkung zu der Arbeit von Isabolinski u. Gitowitsch, S. 287.

Böing, W., Untersuchungen über Blutschmarotzer bei einheimischem Vogelwild. Mit 2 Tafeln, S. 312.

Brünn, W., Ueber den Einfluß des Chinins auf das Parasitenbild bei Protosoma, S. 328.

Knorr, Maximilian, u. **Gehlen, Walther,** Untersuchungen über einen Erreger der ägyptischen Augenentzündung (Koch-Weeks'sches Bakterium) und seine Beziehungen zum Pfeiferschen Influenzabazillus. Mit 3 Abbildungen im Text, S. 295.

Kollath, Werner, Vitaminähnliche Substanzen in ihrer Wirkung auf das Wachstum der Influenzabazillen (Baz. Pfeiffer). 3. Mitteilung: Die Rolle des sogenannten X-Faktors für die Biologie der Influenzabazillen. Mit 1 Abbildung im Text, S. 279.

Kovács, Nikolaus, Untersuchungen über die Technik der Anaërobenzüchtung. I. Mitteilung. Mit 1 Abbildung im Text, S. 344.

Mejlbo, E., Ein Fall von spontaner Infektion mit Novys Bazillus (Bac. oedematiens Weinberg und Séguin) bei einem Schwein, S. 339.

Nodake, R., Einige Versuche zur Gewebsantisepsis bei Staphylokokkeninfektionen, S. 289.

Sonnenschein, Curt, Zur Kenntnis bakteriophagenähnlicher Erscheinungen. Fleckenartige Aufhellungen in Sproßpilzrasen (Monilia). Mit 1 Tafel, S. 257.

Yokota, K., Neue Untersuchungen zur Kenntnis der Bakteriengeißeln. 2. Mitteilung. Mit 1 Tafel, S. 261.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5338

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 95. Heft 7/8.

Ausgegeben am 1. August 1925.

Nachdruck verboten.

Reduktionsversuche mit Bakteriophagen.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der kgl. ung. Pázmány-Péter-Universität zu Budapest (Direktor: Prof. Dr. Hugo v. Preisz).]

Von Dr. **L. Gózony** und Dr. **L. Surányi.**

Das Reduktionsvermögen ist eine charakteristische Eigenschaft der lebenden Zelle. Es wurde nachgewiesen, daß bei gleichen Versuchsbedingungen eine Parallelität zwischen dem Grad der Reduktion und der Zahl der lebenden Keime besteht. Eiweiß, Eiweißprodukte, Kohlehydrate sowie gewisse p_H haben einen fördernden Einfluß auf die Reduktion. Da tote Mikroben kein Reduktionsvermögen besitzen, kann die Reduktionsprobe zur Entscheidung, ob wir es mit toten oder lebenden Mikroben zu tun haben, herangezogen werden. Das Fehlen der Reduktion spricht unbedingt gegen das Belebtsein einer Substanz. Das Gegenteil trifft aber nicht zu, da Substanzen unbelebter Natur auch eine Reduktion aufweisen können.

Der Nachweis der belebten oder unbelebten Natur des Bakteriophagen ist eins der schwersten Probleme. Bisherigen Versuchsergebnissen nach scheint es außer Frage zu stehen, daß die Bakteriophagie an Substanzen korpuskulären Charakters gebunden ist. Da der Bakteriophage sich unendlich zu vermehren vermag, können einige Forscher diesen Befund nur mit dem belebten Charakter des wirksamen Agens in Einklang bringen.

Sollte es gelingen, mit einer Phagenflüssigkeit, welche keine anderen lebenden Keime enthält, eine Reduktion zu erreichen, so hätten wir einen schönen Beweis für die belebte Natur des Bakteriophagen.

Zu diesem Zwecke haben wir mit mehreren bakteriophagenhaltigen Bouillonfiltraten Reduktionsproben angesetzt, welche ausnahmslos ein negatives Resultat ergaben. Bedenkt man, daß eine solche Bouillon in einer mehrmillionenfachen Verdünnung noch wirksam sein kann und demnach in einer unverdünnten Phagenflüssigkeit die Phageneinheiten in einer horrenden Zahl anwesend sein müssen, so müßte man schon aus diesen Versuchen den Schluß ziehen, daß der Bakteriophage nicht belebt sein kann. Wir wissen aber aus Filtrationsversuchen, daß der Bakteriophage sehr winzig sein muß, andererseits ist nachgewiesen, daß der Bakteriophage sich nur auf Kosten in Vermehrung befindlicher sensibler Mikroben zu vermehren vermag. Es ist daher unmöglich, in einer gewissen Flüssigkeitsmenge die Zahl der Phageneinheiten ohne Bakterien zu steigern. Man könnte die obigen negativen Ergebnisse auch damit erklären, daß trotz der horrenden Zahl der Phageneinheiten in einer gewissen Flüssigkeitsmenge zufolge ihrer Kleinheit so wenig Sauerstoff verbraucht wird, was durch Reduktionsproben nicht nachweisbar ist. Die negativen Ergebnisse könnten aber auch eine andere Deutung zulassen; es wäre nämlich auch möglich, daß der Bakteriophage

nur Lebenserscheinungen äußert, wenn er sich in Vermehrung befindet und ein Verbrauch an Sauerstoff durch Reduktion nur in diesem Zustand nachweisbar ist.

Zur Prüfung dieser Möglichkeit haben wir in folgenden Versuchen junge Bouillonkulturen sensibler Bakterienstämme mit Bakteriophagen, in Kontrollreihen dagegen mit gekochten Bakteriophagen angesetzt und bei solcher Versuchsanordnung die Reduktion beobachtet. 50 ccm einer 3stünd. (37° C) Bouillonkultur des Bac. rattimors werden in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wird mit 1 ccm aktiver, der andere dagegen mit 1 ccm gekochter Phagenflüssigkeit versetzt. Beide Teile werden dann auf je 4 Reihen zu je 5 Röhrchen à 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 ccm verteilt und mit Bouillon auf 1 ccm ergänzt. Das 1. Reihenpaar wird sofort, die übrigen nach $^1/_2$-, 1- und 2stünd. Verweilen im Brutschrank mit einigen Tropfen Methylenblaulösung versetzt, mit Paraffinöl verschlossen und bei Zimmertemperatur das Fortschreiten der Reduktion in verschiedenen Zeiträumen beobachtet.

Versuchstabelle I.

Sofort nach der Mischung:

	Gekochter Phage	Aktiver Phage
[1]) Röhrchen	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Zimmertemperatur 35 Min.	0 0 0 0 1	[2])0 0 0 0 1
„ 90 „	0 0 1 2 5	0 0 1 2 5
„ 140 „	0 0 1 4 5	0 0 1 4 5
Nach $^1/_2$ Std. Brutschranktemperatur:		
Zimmertemperatur 35 Min.	0 0 0 0 1	0 0 0 0 2
„ 45 „	0 0 0 0 1	0 0 0 1 3
„ 75 „	0 0 1 2 4	0 0 1 3 5
„ 90 „	0 0 1 3 5	0 0 2 4 5
Nach 1 Std. Brutschranktemperatur:		
Zimmertemperatur 30 Min.	0 0 0 0 0	0 0 0 1 1
„ 40 „	0 0 0 0 1	0 0 2 3 4
„ 50 „	0 0 0 1 1	0 1 3 5 5
„ 60 „	0 0 1 2 3	0 1 4 5 5
„ 80 „	0 0 3 4 5	0 3 5 5 5
„ 120 „	0 0 4 5 5	0 5 5 5 5
Nach 2 Std. Brutschranktemperatur:		
Zimmertemperatur 30 Min.	0 0 0 0 0	0 0 1 1 1
„ 40 „	0 0 1 1 1	0 1 4 4 4
„ 45 „	0 1 2 2 2	0 2 5 5 5
„ 60 „	0 1 3 3 3	0 4 5 5 5

Dieser Versuch zeigte, daß sofort nach der Mischung beide Reihen gleichmäßig reduzierten, aber nach $^1/_2$ und noch mehr nach 1—2 Std. die aktive Reihe bedeutend stärker reduziert wurde, als die Kontrollreihe mit dem gekochten Phagen. Einen anderen Versuch haben wir mit je 7 Reihen angesetzt und nach längerem Aufenthalt im Brutschrank bis zu $6^1/_2$ Std. beobachtet (Tabelle II).

---

1) Röhrcheninhalt: 0,2 ccm Phagenmischung 0,4 ccm Phagenmischung
0,8 „ Bouillon 0,6 „ Bouillon usw.

2) 0 = keine Reduktion, 5 = Vollkommene Reduktion, 2—4 Zwischenstufen.

Versuchstabelle II.

Sofort nach der Mischung:

	Gekochter Phage					Aktiver Phage				
Röhrchen	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Zimmertemperatur 30 Min.	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
„ 45 „	0	0	0	1	2	0	0	1	2	3
„ 60 „	0	0	0	2	2	0	0	2	4	4
„ 75 „	0	0	1	2	3	0	0	2	5	5
„ 120 „	0	1	1	3	4	0	1	3	5	5
Nach 1 Std. Brutschranktemperatur										
Zimmertemperatur 30 Min.	0	0	0	1	2	0	0	1	1	2
„ 45 „	0	0	1	3	4	0	1	3	4	5
„ 60 „	0	0	1	3	5	0	2	4	5	5
„ 75 „	0	1	2	4	5	0	3	5	5	5
„ 90 „	0	1	3	5	5	0	5	5	5	5
„ 120 „	0	2	5	5	5	0	5	5	5	5
Nach 2 Std. Brutschranktemperatur:										
Zimmertemperatur 30 Min.	0	0	0	1	1	0	0	2	5	5
„ 60 „	0	2	3	4	4	0	2	5	5	5
„ 75 „	0	3	5	5	5	0	3	5	5	5
„ 120 „	2	5	5	5	5	0	4	5	5	5
Nach 3 Std. Brutschranktemperatur:										
Zimmertemperatur 30 Min.	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
„ 45 „	0	1	2	2	2	0	0	0	1	2
„ 60 „	0	3	5	5	5	0	0	3	4	5
„ 120 „	2	5	5	5	5	2	5	5	5	5
Nach 4 Std. Brutschranktemperatur:										
Zimmertemperatur 30 Min.	1	2	3	3	3	0	0	0	0	1
„ 60 „	2	4	5	5	5	0	0	0	2	0
„ 105 „	5	5	5	5	5	0	0	0	2	1
Nach $5^1/_4$ Std. Brutschranktemperatur:										
Zimmertemperatur 30 Min.	1	3	3	3	3	0	0	0	0	0
„ 60 „	4	5	5	5	5	0	0	0	0	0
„ 75 „	5	5	5	5	5	0	1	1	1	1
Nach $6^1/_2$ Std. Brutschranktemperatur:										
Zimmertemperatur 30 Min.	1	3	1	1	1	0	2	0	4	1
„ 60 „	4	5	2	2	1	1	4	3	5	0

Wie ersichtlich, reduziert auch jetzt die aktive Reihe bis zur 2. Std. viel intensiver als die Kontrollreihe. Nach 3stünd. Bebrütung ist die Reduktion der aktiven Reihe viel geringer. In 4stünd. Reihe ist kaum eine Reduktion zu verzeichnen, wogegen die entsprechende Kontrollreihe eine mächtige Reduktion aufwies. In der $5^1/_4$ Std.-Reihe zeigen die Phagenröhrchen keine Reduktion mehr, obwohl bei der Kontrollreihe jetzt die stärkste Reduktion zu verzeichnen ist. Nach $6^1/_2$ Std. reduzieren wieder beide Reihen, die Kontrollreihe deutlich besser als die aktive Reihe.

Durch diese Versuche wäre die Annahme, daß bei Anwesenheit von sich vermehrenden sensiblen Bakterien der Bakteriophage einen Sauerstoffverbrauch aufweist und dadurch Methylenblau reduziert, bewiesen. Gelegentlich dieses Versuches haben wir auch die Beobachtung gemacht, daß bei der $5^1/_4$ Std.-Reihe die Phagenröhrchen ziemlich klar waren. Dieser Befund macht es wahrscheinlich, daß die Abnahme der Reduktion mit der Abnahme der Bakterienzahl in engem Verhältnis steht. Diese Annahme suchten wir durch ähnliche Versuche, verbunden mit Keimzählung, zu stützen (Tab. III).

Versuchstabelle III.

	Gekochter Phage	Aktiver Phage
Sofort nach der Mischung:		
Röhrchen	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Zimmertemperatur 45 Min.	0 0 0 0 1	0 0 0 0 1
„ 60 „	0 0 0 1 2	0 0 0 1 2
„ 120 „	0 0 1 4 5	0 0 1 4 5
Keimzahl in 1 ccm	5 000 000	4 900 000
Nach 1 Std. Brutschranktemperatur:		
Zimmertemperatur 45 Min.	0 0 0 0 1	0 0 0 0 1
„ 60 „	0 0 0 1 1	0 0 1 1 2
„ 75 „	0 0 1 3 3	0 0 2 3 3
Keimzahl in 1 ccm	85 000 000	103 000 000
Nach 2 Std. Brutschranktemperatur:		
Zimmertemperatur 45 Min.	2 2 2 2 2	3 3 3 3 3
„ 60 „	3 3 3 3 3	4 4 4 4 4
„ 80 „	4 4 4 4 4	5 5 5 5 5
Keimzahl in 1 ccm	237 300 000	321 000 000
Nach 4 Std. Brutschranktemperatur:		
Zimmertemperatur 60 Min.	3 3 3 3 3	0 1 1 2 2
„ 90 „	3 3 4 4 4	0 1 1 2 3
Keimzahl in 1 ccm	322 500 000	20 250 000

Durch diesen Versuch ist einwandfrei bewiesen, daß sofort nach der Mischung Reduktion und Bakterienzahl in beiden Reihen gleich sind. Nach 1 Std. Brutschranktemperatur war die Keimzahl in den Phagenröhrchen größer als in Kontrollreihen, und demgemäß war auch die Reduktion stärker. Nach 2stünd. Brutschranktemperatur waren diese Verhältnisse zugunsten der Phagenreihe noch weiter fortgeschritten. Nach 4 Std. aber war die Keimzahl in der Kontrollreihe bedeutend höher, und demgemäß war die Reduktion in der Phagenreihe viel schwächer.

Die beschriebenen Versuche haben wir mit dem Bac. murimors, Bac. typhi murium, Bac. typhi, Bac. dysenteriae und Bac. coli sowie entsprechenden Bakteriophagen wiederholt und immer ganz gleiche Resultate erhalten.

Unsere bisherigen Versuchsergebnisse zusammenfassend, können wir sagen, daß bei einer gewissen Versuchsanordnung der Bakteriophage bis 2 Std. die Reduktion zwar fördert, diese Förderung aber dadurch bedingt ist, daß gleichzeitig die Bakterienvermehrung gefördert wird.

Diese Annahme wird bestätigt durch unsere weiteren Versuche. Wenn nämlich die Reduktionszunahme nicht den Sauerstoffverbrauch des Bakteriophagen anzeigt, sondern dadurch bedingt ist, daß der Bakteriophage einen Reiz auf die Bakterien ausübt, zufolge dessen sich eine gesteigerte Bakterienvermehrung und demgemäß ein Sauerstoffmehrverbrauch bemerkbar macht, so spielt in diesem Falle die Menge des Bakteriophagen keine bedeutende Rolle, und man müßte auch mit hochverdünnten Bakteriophagen die obigen Resultate erhalten. Bei der nachstehenden Versuchsreihe sind wir derart vorgegangen, daß wir zu je 1 ccm der 1000-, 10000-, 100000-, 500000-, 1-, 2- und 4millionenfachen Bakteriophagenverdünnung 4 ccm Rattimors-Bouillonkultur gaben, so daß dadurch der Bakteriophage eine weitere 5fache Verdünnung erhielt. Die Röhrchen wurden sonst wie vorher behandelt (Tab. IV).

Versuchstabelle IV.

Min.	gekochter Phage	Phagenverdünnungen zu						
		1000	10 000	100 000	500 000	1 000 000	2 000 000	4 000 000
10	0 0 0 0 0	0 0 1 2 3	0 0 1 2 3	0 0 0 2 3	0 0 0 2 3	0 0 0 1 2	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
15	0 0 0 1 2	0 0 4 5 5	0 0 1 3 4	0 0 1 3 4	0 0 1 3 4	0 0 0 2 3	0 0 0 1 2	0 0 0 1 2
20	0 0 1 2 3	0 1 5 5 5	0 1 4 5 5	0 0 2 4 5	0 0 3 4 5	0 0 2 4 5	0 0 1 3 3	0 0 0 3 3
25	0 0 2 4 4	0 2 5 5 5	0 3 5 5 5	0 2 5 5 5	0 1 5 5 5	0 1 4 5 5	0 0 2 4 4	0 0 2 4 4
30	0 0 3 5 5	0 3 5 5 5	0 4 5 5 5	0 4 5 5 5	0 4 5 5 5	0 4 5 5 5	0 0 3 5 5	0 0 3 5 5
40	0 2 5 5 5	0 3 5 5 5	0 4 5 5 5	0 5 5 5 5	0 4 5 5 5	0 4 5 5 5	0 2 5 5 5	0 2 5 5 5

Als Ergebnis ist zu verzeichnen, daß der Bakteriophage auch in Verdünnungen bis zu 1:5 Millionen die Reduktion zu fördern imstande ist. Die letzte noch reduktionsfördernde Verdünnung entspricht der auf andere Art bestimmten Titerhöhe des Bakteriophagen.

Auch diesen Versuch haben wir mit verschiedenen Bakterienarten wiederholt, und zwar mit ganz gleichen Ergebnissen, so daß wir die soeben beschriebene Versuchsanordnung auch zur Beurteilung der Stärke einer bakteriophagenhaltigen Flüssigkeit für eine leicht durchführbare, brauchbare Methode halten.

Nachdruck verboten.

Ueber den Kern und den allgemeinen Bau der Bakterien[1])

(zugleich ein Beitrag zur Theorie der Lipoidfärbungen).

[Aus der parasitologischen und vergleichend-pathologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Lubarsch).]

Von Dr. med. **M. Gutstein**, Berlin.

Mit 3 Abbildungen im Text und 1 Tafel.

Inhaltsübersicht.

Färberische Darstellung und chemischer Bau der Bakterieneinschlüsse.

I. Makrogranulum. 1) Darstellung an: a) Hefezellen, b) grampositiven Bakterien, c) gramnegativen Bakterien. 2) Mikrochemie. a) Verhalten gegenüber basischen Farbstoffen, b) Löslichkeit, c) Verhalten gegen Sudan, d) Gramfestigkeit.

II. Theorie der Lipoidfärbung. 1) Saure Lipoide. 2) Neutrale Lipoide.

III. Sporenanlagen (Vorsporen). 1) Membran (Proteophosphatid). 2) Innenkörper (neutrales Lipoid). 3) Mikrogranulum.

IV. Mikrogranula. 1) Saures Lipoid, nachweisbar durch: a) Gramsche Färbung, b) basische Farbstoffe, c) Sudan. 2) Eigenschaften: a) Eisengehalt, b) Indophenolblausynthese. 3) Basische Grundsubstanz.

V. Bau der Sporen. 1) Doppelmembran. 2) Zwischenschicht (neutrales Lipoid). 3) Makrogranula (saures Lipoid). 4) Innenkörper (neutrales Lipoid). 5) Mikrogranulum.

---

1) Auszugsweise mitgeteilt im Vortrag Mikrobiologische Gesellschaft zu Berlin vom 19. Jan. 1925. (Centralbl. f. Bakt. Abt. Ref. Bd. 78. S. 561.)

Geschichtlicher Rückblick.

„Die Frage, ob die Bakterien wie die Zellen höherer Lebewesen, die bekannten beiden Hauptbestandteile der Zelle, Kern und Protoplasma enthalten, ist von zahlreichen Forschern bearbeitet worden, ohne daß bisher eine Einigung erzielt wäre. Vielmehr stehen die Ansichten einzelner Autoren scheinbar ganz unvermittelt einander gegenüber, so daß es auf den ersten Blick fast unmöglich erscheint, in dieser Frage — die auch für die allgemeine Biologie von höchstem Interesse ist — zu einem abschließenden Urteil zu kommen." (Gotschlich, Feinerer Bau der Bakterienzelle, in Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorganismen. Bd. 1. S. 50 ff.) Die Schwierigkeiten sind nach Gotschlich in erster Linie dadurch verursacht, daß man den Begriff „Kern", der an den Zellen höherer Lebewesen gewonnen worden ist, ohne weiteres auf die Erforschung der Bakterienzelle zu übertragen versucht hat. Die Verhältnisse lägen aber bei den Bakterien hier bei der Kernfrage prinzipiell anders als bei den Zellen höherer Lebewesen, und zwar aus 2 Gründen. Erstens sei die Entwicklung der morphologischen Elemente bei den Bakterien, die auf der untersten Stufe der Lebewesen stünden, eine viel primitivere und einfachere, und zweitens sei die Möglichkeit der Differenzierung nach verschiedenen Richtungen bei den einzelnen Arten infolge der Unkompliziertheit des Ausgangsmaterials eine viel weitgehendere.

Ueber die Frage, ob die Bakterien im allgemeinen einen richtigen Kern besitzen, existieren in der Literatur im wesentlichen vier verschiedene Ansichten. 1) Die Bakterien sind kernlose Zellen [Fischer, Migula, Massart (1)], da sie weder in ungefärbtem Zustande noch bei den gewöhnlichen Färbemethoden mit basischen Farbstoffen einen isolierten Bestandteil im Zellprotoplasma erkennen lassen. 2) Der ganze Zelleib der Bakterien stelle das Analogon des Kernes dar [Zettnow, Ruzicka, Ambros (1, 2)]. Nach dieser Ansicht wären also die Bakterien als „nackte Kerne" ohne Protoplasma aufzufassen. 3) Die Bakterien enthalten Kerne, die zwar **chemisch** vom Plasma vollständig getrennt sind, die aber morphologisch meistenteils noch nicht genügend differenziert sind [Weigert, Mithrofanow, Bütschli, neuere Theorie von Zettnow, Schaudinn (1, 2)]. Eine Modifikation der letzten Theorie stellt die Ansicht mehrerer Forscher dar, nach der die Bakterien statt eigentliche Kerne nur feine Kernkörnchen (Chromidien) enthalten [Schaudinn, Amato, Swellengrebel, Gotschlich (1, 2)]. 4) Die Bakterien enthalten zum Teil echte Kerne [A. Meyer, Grimme, Preisz, (Milzbrand) Reimann u. Krusius, Nakanishi, zum Teil auch Zettnow, Feinberg (1, 2)]. Allerdings sind solche isolierte Kernbestandteile von den verschiedenen Forschern nur bei einzelnen Bakterienarten nachgewiesen worden.

Nach der zusammenfassenden Darstellung von Gotschlich ist an der Tatsache einer mehr oder minder diffusen (alveolären oder netzförmigen) Verteilung des „Chromatins" im Zelleib der Bakterien überhaupt nicht zu zweifeln. Die Meinungsverschiedenheiten bezögen sich nur auf die Deutung dieser prinzipiell gleichen Resultate fast aller Untersucher, indem Ruzicka und seine Schüler daran festhalten, daß der ganze mit basischen Farbstoffen färbbare Zelleib dem

Kern der tierischen Zellen zu vergleichen wäre, während Gotschlich in Uebereinstimmung mit früheren Forschern den diffus im Protoplasma verteilten Kern mit dem Chromidialnetz, das bei Protozoen nachgewiesen worden ist, in Parallele setzt. Die Tatsache, daß bei einzelnen Bakterien distinkte Kerne nachgewiesen worden sind, betrachtet Gotschlich nur als Beweis der Chromidialtheorie, indem er in letztgenannten Fällen eine höhere Differenzierung des im Jugendstadium der Bakterienzelle diffus verteilten Chromatins annimmt. Die Auffassung der bei vereinzelten Bakterien nachgewiesenen isolierten Protoplasmabestandteile in Form von Körnchen, Stäbchen oder Spiralen als Kern stützt sich auf die Tatsache, daß diese Bakterieneinschlüsse bei der Zellteilung eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (polare Anhäufung eines Teiles des „Chromatins" an den beiden benachbarten Polen der frisch abgeschnürten Tochterzellen). Nach Gotschlich sind außerdem bei einigen Bakterien, besonders bei großen Arten, echte Kerne mit allen morphologischen Kennzeichen (Kernmembran, Chromosomen, die sich bei der Teilung verdoppeln) nachgewiesen worden. Von diesen echten Kernen sagt aber Gotschlich, daß sie „offenbar eine Ausnahmestellung" einnähmen (1).

In diesem Zusammenhang muß auch auf die verschiedenen Körnchen der Bakterienzelle eingegangen werden, deren Kernnatur von einigen Untersuchern angenommen bzw. vermutet worden ist. Hierher gehören die „metachromatischen Körnchen" von Babes-Ernst, die von zahlreichen Autoren beschrieben worden sind. Die Körnchen, bei B. diphtheriae als Polkörnchen allgemein bekannt, sind durch ihre starke Lichtbrechung und ihre große Verwandtchaft zu basischen Farbstoffen charakterisiert [Buchner und L. Müller bei Typhus, Podwyssotzki u. Rahmer bei Cholera, Noniewicz, Galli-Valerio und G. Mayer beim Rotzbazillus (1)]. Die Annahme von Marx und Woithe, daß diese Polkörnchen die eigentlichen Träger der vitalen Energie der pathogenen Mikroorganismen darstellen, ist von den meisten Autoren, besonders von Ficker, zurückgewiesen worden (1).

Einen Teil der Bakterienkörnchen hat A. Meyer auf Grund ihrer Färbbarkeit mit Sudan, Dimethylamidoazobenzol, Naphtolblau als aus „Fett" bestehend angenommen. Die säurefesten Körnchen von Bunge (bei Milzbrand) sollen ebenfalls hierher gehören [Grimme, Eisenberg (2)].

Als Volutin bezeichnet A. Meyer andere Körnchen, die sich ebenfalls mit basischen Farbstoffen färben und einer Differenzierung mit 1proz. Schwefelsäure standhalten. Die Polkörnchen der Diphtheriestäbchen sollen aus Volutin bestehen. Auf Grund ihrer Grünfärbung durch Methylenblau-Phosphin hat Schumacher (3) diese Polkörnchen als freie Nukleinsäure charakterisiert.

Zusammenfassend sagt über diesen Punkt Gotschlich, daß Ficker, Ernst, Ruzicka und Ottolenghi übereinstimmend zu dem Schluß gelangen, „daß die Frage der Körnchen in den Bakterien eine sehr komplizierte und durchaus noch nicht völlig spruchreife ist" (1).

Wenn man die bisherigen Befunde, die in der Literatur von zahlreichen Untersuchern niedergelegt sind, kritisch betrachtet, so scheint uns folgendes festzustehen: 1) Die Untersuchungsbefunde (vgl. Tafel bei Gotschlich, l. c.) betreffend isolierte Bestandteile des Bakterienleibes in Form von größeren oder kleineren Körnchen, Stäbchen, Spi-

ralen usw. sind unseres Erachtens sowohl in morphologischer als auch in chemischer Beziehung anscheinend nicht einheitlicher Natur. 2) Die Annahme, daß diese Gebilde sämtlich oder zu einem Teil den eigentlichen „Kern" der betreffenden Bakterien darstellten, ist nicht ausreichend begründet. Denn die Tatsache, daß diese isolierten Bestandteile sich mit basischen Farbstoffen intensiv färben, reicht unseres Erachtens noch nicht hin, um sie als „Chromatin" zu charakterisieren. Diese Bezeichnung ist um so weniger begründet, als über diese angeblichen Chromatinkörner seitens der Untersucher keinerlei Angaben gemacht worden sind, die in irgendeiner Beziehung, abgesehen von ihrer Basophilie, zur Charakterisierung in chemischer Beziehung dienen könnten. Wenn man aber, wie z. B. Gotschlich es tut, geltend macht, daß diese Granula unmittelbar nach der Teilung eines Bakteriums sich an den benachbarten Polen der Tochterzellen anhäufen, so ist darauf zu erwidern, daß auch durch diesen Befund die Kernnatur keineswegs erwiesen ist. Denn es könnte sich hierbei ebensogut um Protoplasmaverdichtungen handeln, wie es seitens einiger Forscher auch tatsächlich zum Teil angenommen wird.

Färberischer Nachweis der Bakterieneinschlüsse.

Zur morphologischen und mikrochemischen Untersuchung der Bakterieneinschlüsse haben wir uns zuerst mit Erfolg der Hefezellen bedient. Dieses Material bietet wegen seiner leichten Zugänglichkeit und besonderen Größe der Zellen bedeutende Vorteile. Die Hefezellen haben uns auch bei den Untersuchungen über den Bau des Ektoplasmas der grampositiven Bakterien deswegen vorzügliche Dienste geleistet. Die Untersuchungsergebnisse, die zuerst an der Hefezelle gewonnen worden sind, konnten dann mit annähernd denselben oder nur wenig modifizierten Methoden auch an den viel kleineren Bakterien bestätigt werden.

Gelegentlich der Untersuchung über den Bau des Ektoplasmas haben wir an Hefezellen und Bakterien durch Vorbehandlung mit bestimmten chemischen Lösungsmitteln mehrere Abbaustufen dargestellt. Der partielle Abbau der Bakterien hat nun gezeigt, daß man folgende drei wohl definierbare Zelleinschlüsse charakterisieren kann, und zwar: 1) das Makrogranulum, 2) Sporenanlagen, 3) Mikrogranula. Zur systematischen Untersuchung der Bakterieneinschlüsse hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die folgenden drei Abbaustufen der Hefezellen und Bakterien zu unterscheiden, und zwar: I. Vorbehandlung mit verdünnter Salzsäure bei gewöhnlicher Temperatur (Nachweis des Makrogranulums), II. Vorbehandlung mit verdünnter heißer Salzsäure mit oder ohne nachfolgender Alkoholextraktion (Nachweis der Sporenanlagen), und III. Nachbehandlung der Mikroben von II mit Salzsäurealkohol (Nachweis der Mikrogranula).

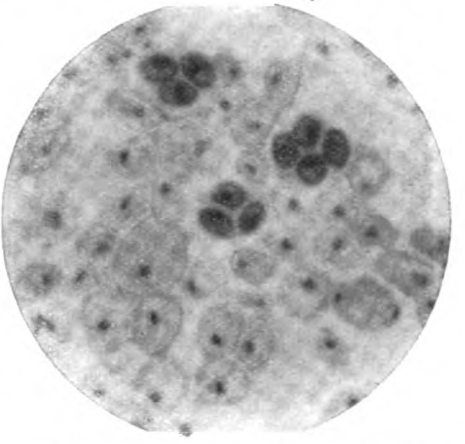
I. Darstellung des Makrogranulums.

Wenn es mittels später zu beschreibender Färbemethoden gelingt, auch an den unvorbehandelten Hefeausstrichen, wenigstens in einem Teil der Zellen, das Makrogranulum sichtbar zu machen, so ist es jedoch viel leichter, diesen Nachweis an jeder Hefezelle zu erbringen, nach-

dem man durch Vorbehandlung mit verdünnter Salzsäure die Nukleoproteide des Zelleibes völlig entfernt hat.

Technik. Die in üblicher Weise hitzefixierten Hefeausstriche werden in eine Kuvette mit 10—25proz. Salzsäure (Ac. mur. conc. 10—25,0 Aqu. dest. ad. 100) gestellt, wo sie bei gewöhnlicher Temperatur 24 Std. oder länger verweilen. Nach der Herausnahme werden die Objektträgerausstriche mit Leitungswasser gründlich abgespült und dann 2—5 Min. mit Karbolmethylenblau gefärbt, abgespült und getrocknet.

Makroskopisch erscheinen die Hefeausstriche nur sehr schwach bläulich gefärbt. Unter dem Mikroskop erkennt man aber in den schwach bläulich gefärbten Hefezellen ein dunkelblaues Granulum, das bei Oelimmersion etwas über stecknadelkopfgroß ist. Das Makrogranulum ist im Zellleib exzentrisch gelegen, oft am Rande von runder oder ovaler Form. Zuweilen scheint es sich aus kleinen bläulichen Pünktchen zusammenzusetzen. Die Sporen haben eine dicke, dunkelblaue Membran und lassen außerdem im Innern ein Makrogranulum, daneben zuweilen auch ein Mikrogranulum erkennen. Die Kapsel der Hefesporen ist ungefärbt bzw. kaum angedeutet (s. Textfig. 1).



Textfig. 1. Hefeausstrich. HCl-Vorbehandlung. Karbolmethylenblaufärbung. Mikrophotographie. Reichert $^1/_8$". Kompensationsokular 6. 30 cm Auszug. Osram 100 Kerzen Punktlampe. Rotlichtfilter. 10' Expos.

Schönere Bilder erhält man, wenn man eine Darstellung des Ektoplasmas mittels Tannins anschließt. Durch die Nachbehandlung mit Tannin wird der Kern nicht entfärbt.

Karbolmethylenblau-Tannin-Safranin-Methode.

Technik. Die mit Salzsäure vorbehandelten Hefeausstriche werden 3—5 Min. mit Karbolmethylenblau gefärbt, abgespült, 1—2 Min. mit 5proz. Tannin nachbehandelt, abgespült und mit Safranin ($^1/_2$—1 Min.) oder Pyronin (1 Min.) oder Fuchsin ($^1/_2$—1 Min.) nachgefärbt, abgespült und getrocknet (Fig. 1).

Die Hefezellen zeigen ein blaues Makrogranulum, das Ektoplasma ist dunkelrot gefärbt. Daneben erkennt man in einem Teil der Zellen kleine punktförmige rote Mikrogranula und kreisförmige helle Ringe, die — wie ich später zeigen werde — zu den Sporenanlagen gehören.

Da die Bakterien im Vergleich zur Hefezelle viel kleiner sind, so ist bei ihnen der Nachweis des Makrogranulums wegen seiner Kleinheit nur in Verbindung mit einer Ektoplasmadarstellung möglich. An den grampositiven Bakterien gelingt daher die Darstellung des Makrogranulums mit der oben bei der Hefe beschriebenen Karbolmethylenblau-Tannin-Safranin-Methode sehr leicht. Bei den einzelnen Arten ergeben sich folgende Bilder:

Milzbrand. 1 oder 2 runde blaue Granula, zum Teil in Hantelform oder in Stäbchen; letztere scheinen sich oft in einzelne Teile abzuschnüren. Die Granula liegen gewöhnlich zentral zum Bakterium. Der Zelleib ist ungefärbt, das Ektoplasma

rot gefärbt. Zwischen den einzelnen Stäbchen oder an der Längsseite erkennt man außerdem dunkelrote kleine Pünktchen (Mikrogranula). Die in den Bakterien liegenden unfertigen Sporen sind farblos, von meist ovaler Gestalt, von einer roten Membran umgeben und haben oft an einem oder an beiden Polen winzige blaue Pünktchen. Die freien Sporen zeigen ein schwachbläuliches Zentrum mit einer rötlichen schmalen Membran, oft mit einem kleinen blauen Pünktchen am Rand (Fig. 5).

Diphtherie. Runde oder ovale, 1—2 dunkelblau gefärbte Granula, die meist zentral zum Bakterium, zuweilen auch näher dem Rande gelegen sind. Der Zelleib ist ungefärbt, das Ektoplasma rot. In langen Stäbchen sieht man meistens mehrere, 3—5 Granula. Zum Unterschied von den Polkörnern liegen die Granula meist nicht polar angeordnet, sondern etwas von den Polen entfernt.

Staphylo-, Streptococcus. Rundes, exzentrisch gelegenes blaues Granulum von etwa $^1/_3$—$^1/_4$ der Größe des Zelleibes. Einzelne Kokken enthalten zwei längliche blaue Gebilde. Der Zelleib ist ungefärbt, das Ektoplasma rot. In üppig wachsenden Kulturen enthalten die meisten Kokken zwei, meist längliche, oft auch vier, mehr rundliche blaue Granula.

Pneumococcus. Jedes Bakterium enthält ein rundes, meist exzentrisch gelegenes blaues Granulum. In einzelnen sieht man statt dessen zwei mehr längliche Körperchen, die mit der Längsseite einander gegenüberliegen. Bei in Teilung begriffenen Kokken liegen die beiden Granula an der Berührungs- und Abschnürungsstelle, wo sich die beiden Tochterkokken noch berühren.

Nachweis des Makrogranulums an den gramnegativen Bakterien.

Wie ich an anderer Stelle gezeigt habe [vgl. Vortrag Mikrobiolog. Ges. zu Berlin 19. 1. 1925 (4)] gelingt es auch, an gramnegativen Bakterien das Ektoplasma nachzuweisen, und zwar durch Beizung mit konzentrierter 30proz. Tanninlösung und Nachfärbung mit der wässerigen Lösung eines basischen Farbstoffes. Der Nachweis des Makrogranulums an den Gramnegativen gelingt daher in derselben Weise wie bei den Grampositiven, nur mit dem Unterschiede, daß statt des 5proz. Tannins mit einer konzentrierten Lösung gebeizt wird. Da diese Tanninlösung wegen ihrer Säureeigenschaften bei längerer Einwirkung unter Umständen das Makrogranulum entfärben kann, empfiehlt es sich, nur kurz, etwa 1 bis höchstens 2 Min. mit konzentriertem Tannin nachzubehandeln.

Technik. Die mit verdünnter Salzsäure vorbehandelten Bakterienausstriche der Gramnegativen werden 3—5 Min. mit Karbolmethylenblau gefärbt, mit Wasser abgespült, mit 30proz. Tannin 1 Min. gebeizt, abgespült, mit Safranin 1—2 Min. nachgefärbt, abgespült und getrocknet.

Die Stäbchenformen (Coli-, Proteus-, Typhus usw. [vgl. Fig. 6 Proteus]) enthalten 1 bis 2 runde blaue Granula, der Rest des Zellleibes ist ungefärbt, das Ektoplasma ist rot. Die Kugelformen (vgl. Fig. 7, Gonococcus) enthalten ebenfalls 1 rundes Granulum, meistenteils aber 2, die 2 Individuen angehören, die aber in einer gemeinsamen roten Ektoplasmahülle zusammengeschlossen sind.

Eigenschaften und chemischer Bau des Makrogranulums.

Die oben geschilderte Karbolmethylenblau-Tannin-Safranin-Methode zum Nachweise des Makrogranulums der grampositiven und gramnegativen Bakterien — nach Vorbehandlung der Bakterienausstriche mit verdünnter Salzsäure — stellt nicht das einzige Verfahren dar, mit dem die färberische Darstellung dieses jeder Mikrobe eigentümlichen Gebildes gelingt. Vielmehr hat eine systematische Untersuchung über das färberische Verhalten des Makrogranulums der Hefezelle ergeben, daß

man es fast mit allen basischen Farbstoffen substantiv färben kann. Zweckmäßigerweise können hierbei 2 Gruppen von basischen Farbstoffen unterschieden werden, und zwar 1. solchen Farbstoffen wie z. B Karbolmethylenblau, Pyronin, Neutralviolett extra usw., die in der Hauptsache nur das Makrogranulum färben (an den mit verdünnter Salzsäure vorbehandelten Ausstrichen), während der Zelleib ungefärbt bzw. nur schwach gefärbt erscheint; und zweitens solchen basischen Farbstoffen, wie z. B. Fuchsin, Safranin, Methylviolett usw., die neben dem Makrogranulum auch noch den Zelleib, oft sogar das Ektoplasma anfärben. In diesen Fällen tritt jedoch das Makrogranulum meistens noch mehr oder minder deutlich als dunkler und kräftiger gefärbter Bestandteil des Endoplasmas hervor. Eine distinktere Färbung erhält man jedoch in diesen Fällen, wenn man die Ausstriche nach der Färbung mit stark verdünnter ($^1/_2$—1proz.) Essigsäure nachdifferenziert, wobei der Zelleib schneller als das Makrogranulum entfärbt wird. In der nachstehenden Tabelle I ist das färberische Verhalten des Makrogranulums, Zelleibs und Ektoplasmas der mit verdünnter Salzsäure vorbehandelten Hefeausstriche angegeben. Kolonne 7 u. 8 dieser Tabelle zeigt gleichzeitig, daß Objektträgerausstriche von reinem Lezithin ex ovo dasselbe färberische Verhalten wie das Makrogranulum aufweisen.

Wie aus der nachstehenden Tabelle hervorgeht, färbt sich das Makrogranulum der Hefezellen fast ausnahmslos mit allen basischen Farbstoffen; daß es bei der Färbung z. B. mit Malachitgrün und Viktoriablau nicht deutlich erkennbar ist, hängt damit zusammen, daß diese Farbstoffe die sauren Lipoide des Ekto- und Endoplasmas — Ekto- und Endolipoid —, die ja an den mit verdünnter Salzsäure vorbehandelten Hefezellen noch enthalten sind (vgl. das Ektoplasma der Bakterien 3. u. 4. Mitteilung) — ziemlich intensiv färben, so daß das im Innern des Endoplasmas befindliche Makrogranulum völlig verdeckt wird. Das wird dadurch bewiesen, daß man auch in diesen Fällen durch vorsichtige und kurze Differenzierung mit verdünnter Essigsäure ($^1/_2$—1 Proz.) das Makrogranulum zur Darstellung bringen kann. Besonders unterstrichen zu werden verdient noch die interessante Tatsache, daß chemisch reines Lezithin dieselben färberischen Reaktionen wie das Makrogranulum gibt. Insbesondere ist hierfür die Karbolmethylenblau-Phosphin-Methode beweisend, bei der das Makrogranulum grün und der Zelleib gelb erscheint (vgl. Fig. 3). Bei dieser Methode treten die Sporen in einer Kontrastfarbe hervor, und zwar zeigen sie eine blaue Membran und im Zentrum ein dunkelblaues Makrogranulum, zuweilen auch daneben noch ein kleineres Mikrogranulum. Färbt man ebenso Lezithinausstriche, so zeigen die dicken Ausstriche eine grüne Farbe, während die dünnen durch das Phosphin entfärbt und deshalb gelb erscheinen. Bemerkenswert ist ferner, daß das Ektoplasma bzw. dessen saurer Bestandteil, das Ektolipoid, das, wie ich an anderer Stelle zeigen konnte (4), ein Phosphatid, wahrscheinlich sogar Lezithin enthält, bzw. ist, sich ebenso verhält, wie ein dünner Lezithinausstrich und durch Karbolmethylenblau-Phosphin gelb gefärbt wird. Unterschiede zwischen dicken und dünnen Lezithinausstrichen ergaben sich ferner bei zwei anderen Farbstoffen, nämlich polychrom. Methylenblau und Neutralrot, durch die dicke Ausstriche blauviolett bzw. purpurrot, während dünne rötlich violett bzw.

Tabelle I.

Färberisches Verhalten des Makrogranulums der Hefezellen gegenüber basischen Farbstoffen (substantive Färbung der mit verdünnter Salzsäure vorbehandelten Hefeausstriche).

Lfd. Nr.	Farbstoff	Färbedauer Min.	Makrogranulum	Zellleib	Ektoplasma		Lezithinausstriche		Bemerkung
					Innenmembran	Außenmembran	dick	dünn	
1	Pyronin	2—3	+++	—	angedeutet	—	+++	.	.
2	Neutralrot	5—10	++ rötlich	+ rosa	dunk.-rosa	hellrosa	+++ purp.-rot	hellrosa	.
3	Neutralrot extra (Casella)	10	+++	+ rötlich	—	—	+++	.	.
4	Rhodulinviolett (Bayer)	3	+++	+	angedeutet	—	+++	.	.
5	Safranin	2	++ dunk.-rot	++ rot	+	—	+++	.	.
6	Fuchsin	1—2	++ dunk.-rot	++	+	—	+++	.	.
7	Malachitgrün	3	undeutlich	+++	schw.	—	+++ blaugrün	.	.
8	Brillantgrün	2—3	++	++	+	—	+++	.	.
9	Methylenblau	5—10	+ schw. bläul.	—	—	—	++ blau	.	.
10	Karbolmethylenblau	2—3	+++	angedeutet	—	—	+++	.	Membran u. Granula der Sporen dunkelblau
11	Karbolmethylenblau + Phosphin	3 1	+++ grün	gelb	gelb	—	grün	gelb	Sporen (Membran u. Granula) blau. Fig. 3
12	Neumethylenblau G. G.	3	++	—	—	—	++	.	.
13	Nilblausulfat	2—3	++	+	schw. bläul.	—	+++	.	Sporen dunkelblau
14	Viktoriablau B	2—3	undeutlich	hellblau	+++ dunk.-blau	+ schw. bläul.	+++ d. blau	hellblau	.
15	Neublau B	5	+++	—	—	—	+++	.	.
16	Azur II	2—3	+++	++ hellblau	schw. bläulich	—	+++	.	Mikrogranulum oft rötlich
17	Polychrom. Methylenblau	2—3	++	blau	oft rötlichviolett		+++ blauviolett	rötlich violett	vgl. Fig. 2
18	Neutralviolett extra (Casella)	10	+++	+	—	—	+++	.	.
19	Methylviolett[1])	1—2	+	++	++	—	+++	.	.
20	Thionin	2—3	++	—	—	—	+++	.	.

hellrosa gefärbt werden (vgl. Tabelle I). Auch hier verhält sich das Ektoplasma ebenso wie ein dünner Lezithinausstrich, indem es durch ersteres rötlich violett, durch letzteres hellrosa gefärbt erscheint.

Was das kleinere Makrogranulum der Bakterien betrifft, so zeigt es im wesentlichen dasselbe färberische Verhalten gegenüber basischen Farbstoffen, wie das der Hefezellen, insbesondere wird es

1) Methylviolett-n-blau (Agfa).

durch Karbolmethylenblau-Phosphin ebenfalls grün gefärbt. Bei den Bakterien erhält man aber, wie wir gefunden haben, schönere Resultate, wenn man diese Methode etwas modifiziert, und zwar als Karbolmethylenblau-Tannin-Phosphin verwendet, wobei gleichzeitig das Ektoplasma schön gelb gefärbt erscheint.

Technik. Die Bakterienausstriche, mit verdünnter Salzsäure vorbehandelt, werden 2—5 Min. mit Karbolmethylenblau gefärbt, abgespült, mit 5proz. Tannin 2—3 Min. gebeizt, abgespült, und 1 Min. mit Phosphin nachgefärbt: Makrogranulum grün, Ektoplasma gelb (Fig. 8a Diphtherie, Fig. 8c Staphylococcus).

Bei den Anthraxbakterien (vgl. Fig. 8b), die nach dieser Methode gefärbt werden, erscheinen außer den grünen Makrogranula noch kleinere punktförmige rote Mikrogranula, die meist zwischen den einzelnen Stäbchen, also interbazillär, zuweilen aber auch am Rande des Stäbchens gelegen sind. Die metachromatische Färbung dieser Mikrogranula ist nicht durch das Phosphin bedingt, vielmehr treten sie schon durch die Nachbehandlung mit Tannin hervor und werden durch das Phosphin in der Farbe nicht verändert. Ebenso sieht man an den Diphtheriestäbchen, die nach dieser Methode gefärbt sind, zuweilen ganz winzige rötliche Pünktchen an den Polen, anscheinend als Teil der Polkörnchen.

An den Bakterien gelingt es auch, an unvorbehandelten Ausstrichen ziemlich leicht, das Makrogranulum isoliert zur Darstellung zu bringen, trotzdem die Nukleoproteide hier im Zelleib noch enthalten sind. Die Darstellung gelingt z. B., wenn man die Bakterienausstriche nach der Färbung mit basischen Farbstoffen mit 5proz. Essigsäure differenziert. Schöne Resultate liefern insbesondere die Karbolfuchsin-Essigsäure-Tannin-Methylenblau und Karbolmethylenblau-Essigsäure-Tannin-Safranin-Methoden.

Die Technik dieser Methoden habe ich an anderer Stelle [vgl. Das Ektoplasma der Bakterien, 1. Mitteilung (6)] beschrieben, wo auch die Makrogranula des Pneumococcus (Fig. 3c, d, e) und der Staphylococcus (Fig. 2d) abgebildet sind. In dieser Arbeit wurde der Anschauung Ausdruck gegeben, daß dieses Granulum des Pneumo- und Staphyloococcus freie Nukleinsäure enthielten, und zwar aus dem Grunde, weil es nach dem Aufkochen mit destill. Wasser (2 Min.) oder nach Vorbehandlung mit verdünnter Salzsäure mit diesen Methoden nicht mehr nachweisbar war. Wie spätere Untersuchungen uns aber gelehrt haben, beruht die Annahme auf einem Irrtum. Wie sich später nämlich herausgestellt hat, werden diese Granula an der unvorbehandelten Zelle durch 5proz. Essigsäure nicht entfärbt; dagegen werden sie nach Vorbehandlung der Bakterienausstriche mit verdünnter Salzsäure oder nach dem Aufkochen durch dieselbe Essigsäurelösung entfärbt. Läßt man daher die Essigsäuredifferenzierung weg, so kann man beim Pneumo-Staphylococcus und anderen Bakterien auch nach dem Aufkochen oder Salzsäurevorbehandlung das Granulum z. B. durch Karbolmethylenblau-Tannin-Safranin noch glatt nachweisen. Auch mit Karbolfuchsin läßt sich in diesen Fällen das Makrogranulum sichtbar machen, nur muß man kurz mit $^1/_2$—1proz. Essigsäure differenzieren und mit Tannin-Methylenblau nachbehandeln. Die angebliche Löslichkeit in kochendem Wasser schien für freie Nukleinsäure zu sprechen. Damit stimmte auch überein, daß z. B. das Granulum des Pneumococcus durch Karbolmethylenblau-Phosphin grün gefärbt erschien, und Schumacher (7) diese Reaktion als charakteristisch für freie Nukleinsäure beschrieben hat. Aber auch die Grünfärbung des Makrogranulums der Hefe und Bakterien nach dieser Methode spricht, wie wir heute wissen, nicht mehr für freie Nukleinsäure, nachdem wir zeigen konnten, daß auch Lezithin dieselbe Farbenreaktion gibt.

Die Tatsache, daß sowohl freie Nukleinsäure als auch Lezithin nach der Karbolmethylenblau-Phosphinmethode grün gefärbt erscheint, legte den Gedanken nahe, daß diese Farbenreaktion auf einem Radikal beruhen könnte, die diese beiden Substanzen gemeinsam enthalten. Nun besteht bekanntlich Lecithin aus: Cholin, Fettsäuren, Glyzerin und Phosphorsäure. Andererseits enthalten die Nukleinsäuren ein Kohlehydrat, eine Reihe von basischen Körpern und Phosphor-

säure. Gemeinsam ist diesen beiden, sonst chemisch ganz verschiedenen Substanzen das Phosphorsäureradikal. Es drängte sich daher die Vermutung auf, daß die Grünfärbung des Lecithins und der freien Nukleinsäure durch Karbolmethylenblau-Phosphin auf dem gemeinsamen Phosphorsäureradikal beruhen könnte. Das scheint in der Tat der Fall zu sein. Wie ein einfacher Reagenzglasversuch lehrt, wird nämlich flüssige Phosphorsäure nach Zusatz von Karbolmethylenblau blau gefärbt; setzt man dann Phosphin dazu, so erscheint die Flüssigkeit grün.

Bezüglich der Diphtheriebakterien muß ich noch etwas ausführlicher auf die wichtige Frage eingehen, ob die bekannten Polkörnchen mit den von uns chemisch und färberisch gut charakterisierten Makrogranula identisch sind oder nicht. Um es gleich vorweg zu nehmen, muß diese Frage verneint werden. Die Verschiedenheit dieser beiden Granula läßt sich schon dadurch beweisen, daß an den mit verdünnter Salzsäure vorbehandelten Diphtherieausstrichen die Makrogranula, wie oben ausgeführt, darstellbar sind, während man nach der bekannten Neißerschen Methode die Polkörnerchen nicht mehr nachweisen kann. Die Polkörnerchen scheinen also in verdünnter Salzsäure löslich zu sein. Aber abgesehen von der verschiedenen Löslichkeit lassen sich Polkörnerchen und Makrogranulum auch rein färberisch von einander unterscheiden, und zwar mittels zweier gleich zu beschreibender Methoden.

Karbolazur-Phosphin-Methode.

Mittels dieser Methode werden an unvorbehandelten Diphtherieausstrichen nur die Polkörnerchen, nicht aber das Makrogranulum dargestellt, und zwar in dunkelbrauner bis schwarzer Farbe.

Technik. Ein Diphtheriebakterienausstrich wird mit Karbol-Azur II (1proz. wässerige Azur II-Lösung, 5proz. Karbolwasser zu gleichen Teilen; die Lösung muß filtriert werden) 2—5 Min. gefärbt, abgespült und 2—3 Min. mit Phosphin nachgefärbt, abgespült und getrocknet. Die Polkörnchen scheinen dunkelbraun bis schwarz, der Rest der Stäbchen ist gelb (Fig. 9a).

Dieses Verfahren stellt eine sehr leichte und handliche Methode zum Nachweis der Polkörnchen dar.

Karbolazur-Essigsäure-Tannin-Phosphin-Methode.

Mittels dieser Methode lassen sich an unvorbehandelten Diphtheriebakterienausstrichen Polkörnerchen und Makrogranula in zwei verschiedenen Kontrastfarben gleichzeitig zur Darstellung bringen. Wir haben nämlich gefunden, daß die Polkörnerchen, im Gegensatz zu dem Makrogranulum, durch Karbol-Azur II metachromatisch rot gefärbt erscheinen, wenn man nach der Färbung mit Essigsäure (1—5proz.) differenziert. Noch schönere Resultate erhält man, wenn man nach der Essigsäuredifferenzierung die Präparate mit Tannin beizt und dann mit Phosphin nachfärbt. Dann erscheinen die Polkörnerchen rot, die Makrogranula grün, der Zellleib gelb gefärbt.

Technik. Ein Diphtherieausstrich wird 2—5 Min. mit Karbol-Azur unter Aufkochen gefärbt, abgespült, kurz mit Essigsäure (1—5proz.) abgespült, mit 5proz. Tannin 2 Min. gebeizt, abgespült und mit Phosphin 1 Min. nachgefärbt: Polkörner rot, Makrogranula grün, Ektoplasma gelb (Fig. 9b).

An mit verdünnter Salzsäure vorbehandelten Diphtheriebakterien oder an unvorbehandelten Ausstrichen von Pseudodiphtherie oder an unvorbehandelten Diphtheriebakterien, welche durch Züchtung auf geeigneten Nährböden die Polkörnerchen verloren haben, an denen

nach Neißer keine Polkörnerchen mehr nachweisbar sind, stellt die Karbol-Azur-Essigsäure-Tannin-Phosphin-Methode nur grüne Granula dar.

Da das Makrogranulum sowohl der Hefezellen als auch der Bakterien fast alle basischen Farbstoffe aufnimmt, so muß es auf Grund der chemischen Theorie des Färbeprozesses einen sauren Körper enthalten. Nach der an anderer Stelle auseinandergesetzten Theorie der Beizenfärbung [das Ektoplasma der Bakterien 3/4 (5)] kann man einen sauren Körper auch durch einen sauren Farbstoff färben, vorausgesetzt, daß man mit einer basischen Beize vorbehandelt hat. Deshalb gelingt es, das Makrogranulum z. B. der Hefe auch mit Böhmers Hämatoxylin (enthält den sauren Farbstoff Hämatoxylin und die basische Beize Alaun) nachzuweisen.

Technik. Mit verdünnter Salzsäure vorbehandelter Hefeausstrich wird 10 bis 15 Min. mit Böhmers Hämatoxylin gefärbt, abgespült und $^1/_4$—$^1/_2$ Std. in Leitungswasser gewässert und getrocknet: Makrogranulum dunkel-, Leib hellviolett (Fig. 4). Dasselbe Resultat erhält man auch, wenn man die Hefeausstriche mit einer gesättigten Alaunlösung vorbehandelt und nach Wasserspülung mit einer wässerig-alkoholischen Hämatoxylinlösung (die bekanntlich nicht färbt) nachfärbt.

Löslichkeitseigenschaften des Makrogranulums.

Wie die allgemeine Darstellungsmethode des Makrogranulums lehrt, ist dieses in verdünnter Salzsäure (10—25 Proz.) bei gewöhnlicher Temperatur nicht löslich. Dieser Versuch zeigt, daß das Makrogranulum kein Nukleoproteid und auch keine freie Nukleinsäure enthalten kann, da letztere bekanntlich in verdünnter Salzsäure löslich sind.

Auch eine 24std. Vorbehandlung der Hefeausstriche mit Schweizers Reagenz (Kupferoxyd-Ammoniak) läßt das Makrogranulum nicht zum Verschwinden bringen. Diese Vorbehandlung stellt daher eine zweite Methode dar, die sich zum allgemeinen Nachweis des Makrogranulums gut eignet.

Zur weiteren chemischen Charakterisierung des Makrogranulums der Hefe und Bakterien erschien es notwendig, seine Löslichkeitsverhältnisse einer eingehenden Prüfung zu unterziehen. Für das Verhalten des Makrogranulums gegenüber den chemischen Lösungsmitteln ergaben sich 2 Wege, und zwar durch Einwirkung der betreffenden Reagenzien auf mit verdünnter Salzsäure vorbehandelte Ausstriche, an den — wie oben gezeigt — das Makrogranulum direkt nachweisbar ist; oder durch Prüfung von unvorbehandelten Präparaten, an denen durch die Lösungsmittel zum Teil die störenden Nukleproteide gelöst werden konnten. Diese beiden Prüfungsmethoden mußten ausgeführt werden, weil die eine Methode der Prüfung der vorbehandelten Ausstriche den Einwand berechtigt erscheinen ließ, daß die Löslichkeitsverhältnisse des Makrogranulums durch die Salzsäurevorbehandlung sich wesentlich geändert hätten. Doch hat die eingehende Untersuchung der Löslichkeit der unvorbehandelten Hefeausstriche (Tabelle II) als auch der mit Salzsäure vorbehandelten (Tabelle III) für eine größere Zahl von Lösungsmitteln zu demselben Ergebnis geführt. Die Versuche wurden speziell an Hefeausstrichen ausgeführt. Hinsichtlich der unvorbehandelten Ausstriche muß ich noch bemerken, daß die Darstellung des Makrogranulums — mit der Karbolmethylenblau-Methode —

zum Teil nur nach Differenzierung mit Essigsäure erreicht werden konnte. Da das Makrogranulum durch 5proz. Essigsäure ziemlich schnell entfärbt wird, so mußte mit einer stark verdünnten ($^1/_2$proz.) Essigsäurelösung ganz kurz und vorsichtig nachbehandelt werden.

Tabelle II.

Löslichkeit des Makrogranulums der Hefe, geprüft an unvorbehandelten Ausstrichen.

Lösungsmittel	Einwirkungsdauer	Makrogranulum	Löslichkeit	Bemerkung
Salzsäure 10—25proz.	24—72 Std.	+++	—	.
Schweizers Reagens	24—48 „	+++	—	.
Natriumkarbonat 5proz.	48 Std.	++	—	.
Natronlauge 2proz.	48 „	++	—	.
Ammoniak	24—48 Std.	+++	—	.
Aq. destil.	5 Min. bei 100°	++	—	.
Salzsäure 2proz.	20 Min. bei 100°	—	+	Mikrogranulum ++, Membran d. Vorsporen ++
„ -Alkohol 10proz.	24 Std.	±	∓	In einem Teil des Hefeausstrichs Makrogranulum —
„ „ 25 „	24—48 Std.	—	++	.

Tabelle III.

Löslichkeit des Makrogranulums, geprüft an mit verdünnter Salzsäure vorbehandelten Hefeausstrichen.

Lösungsmittel	Einwirkungsdauer	Makrogranulum	Löslichkeit	Bemerkung
Alkohol 96proz.	24 Std.	+++	—	.
Methylalkohol	24 „	+++	—	.
Alkohol + Aether	24 „	+++	—	.
Natronlauge 2proz.	48 „	+++	—	.
Natriumkarbonat 5proz.	48 „	+++	—	.
Ammoniak	48 „	+++	—	.
Aq. dest	5 Min. bei 100°	++	—	.
Salzsäure 2proz.	20 Min. bei 100°	—	++	Mikrogranulum ++, Membran d. Vorsporen ++
Eisessig	48 Std.	+++	—	.
Ferrozyankalium 2proz.	48 „	+++	—	.
„ 2proz. + Essigsäure 2proz.	48 „	+++	—	.
Natr. aceticum 3proz.	48 „	+++	—	.
Salzsäure-Alkohol 10proz.	48 „	++	—	Mikrogranula ++
dgl. „ „ 25 „	24 „	+	—	
	48—72 Std.	—	++	

Das Verhalten des Makrogranulums gegenüber den verschiedenen Reagenzien ist geeignet, uns Aufschluß über seinen chemischen Bau zu geben. So beweist seine Unlöslichkeit in verdünnter Salzsäure bei gewöhnlicher Temperatur und in kochendem Wasser, daß es nicht aus freier Nukleinsäure oder Nukleoproteiden bestehen kann. (Erstere wird durch kochendes Wasser, die zweite durch verdünnte Salzsäure gelöst). Gegen freies Lipoid oder Neutralfett spricht seine Unlöslichkeit in Alkohol, Aether, Methylalkohol usw. Gegen Neutralfette spricht übrigens

auch seine Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen; bekanntlich nehmen Fette solche Farbstoffe nicht auf. Dagegen macht seine Löslichkeit in Salzsäurealkohol (vgl. Tabelle III) es wahrscheinlich, daß eine Lipoid-eiweißverbindung vorliegt, wie wir eine solche beim Ektoplasma der Hefe und grampositiven Bakterien bereits kennen gelernt haben (5).

Daß tatsächlich hier ein gebundenes Lipoid vorliegt, beweist auch die Färbbarkeit des Makrogranulums durch den typischen Fett- und Lipoidfarbstoff Sudan.

Technik. Ein mit verdünnter Salzsäure vorbehandelter Hefeausstrich wird gründlich abgespült, getrocknet und in eine Kuvette mit Sudanlösung (Alkohol 80proz. 95,0, Azeton 5,0, Sudan bis zur Sättigung) gestellt, wo er ca. 15—20 Min. verbleibt. Nach der Herausnahme wird er kurz mit 50proz. Alkohol, dann mit Wasser abgespült. Glyzerin, Deckgläschen. Mikroskopisch erscheint das Ektoplasma der Hefezellen als eine helle, doppelt konturierte Membran. Im Zelleib sind gelblich- bis braunrote große und kleinere, punktförmige Granula sichtbar, die zum Teil dem Makrogranulum, zum Teil den Sporenanlagen, wie ich später zeigen werde, und den Mikrogranula angehören. Daß das Makrogranulum ebenfalls Sudan aufgenommen hat, erkennt man besonders an denjenigen Zellen, in denen nur ein exzentrisch gelegenes, gelbes bis rotes Granulum, oft auch ein Mikrogranulum enthalten ist (Fig. 10).

Der letzte Versuch, nämlich die Färbbarkeit mit dem indifferenten Farbstoff Sudan, beweist eindeutig, daß das Makrogranulum ein Lipoid enthält. (Neutralfette konnten ja ausgeschlossen werden.) Und zwar enthält es ein gebundenes Lipoid, da es sonst in Alkohol usw. sich lösen müßte. Da aber andererseits das Makrogranulum sich mit allen basischen Farbstoffen färbt, so muß es aus einem sauren Lipoid bestehen, das wahrscheinlich an einen basischen Eiweißkörper gebunden ist. Die isolierte Darstellung dieses Eiweißkörpers mit sauren Farbstoffen ist bislang an Hefezellen und Bakterien noch nicht gelungen, wohl aber an Amöben, wie ich später zeigen werde. Wenn man ferner berücksichtigt, daß das Makrogranulum dieselben färberischen Reaktionen wie Lezithin gibt — auch Lezithinausstriche färben sich mit der oben genannten Sudanlösung prächtig rot —, so dürfte wohl die Annahme berechtigt sein, daß es aus einer Lezithinverbindung besteht (Lezithoproteid). Wenn man aber die gleichen färberischen Reaktionen, die das Makrogranulum aufweist, nicht als bindenden Beweis für das Vorliegen eines Lezithins betrachtet, so dürfte m. E. soviel sicher sein, daß ein Phosphatid den Lipoidbestandteil des Makrogranulums bildet. Für den Phosphorgehalt dieses Lipoids spricht nämlich die Karbolmethylenblau-Phosphin-Reaktion, die, wie ich oben erwähnt habe, wohl auf einem Phosphorsäureradikal beruhen dürfte.

Wenn nun tatsächlich das Makrogranulum der Hefezelle aus einer Lezithineiweißverbindung besteht, so könnte erwartet werden, daß es gramfest ist. Wir haben nämlich nachweisen können (5), daß reines Lezithin, auf Objektträger ausgestrichen, und nach Gram gefärbt, die Farbe bei der Alkoholdifferenzierung nicht abgibt, und daß die grampositiven Bakterien in ihrem Ektoplasma ein Phosphatid, wahrscheinlich ein Lezithinlipoid enthalten. Jedoch stößt der Nachweis der Gramfestigkeit des Makrogranulums auf fast unüberwindliche Schwierigkeiten. Da es sich nämlich im Innern der Zelle befindet, so wird es bei der Gramschen Färbung von der stark blauschwarz tingierten Ektoplasmahülle vollständig verdeckt. Letztere wird nämlich, wie wir zeigen konnten, nach Gram stark gefärbt (5). Entfernt man aber durch Behandlung mit Salzsäurealkohol die gramfeste Substanz aus den Hefeausstrichen, so ist meistens auch das Makrogranulum nicht

mehr nachweisbar. Allerdings gelingt es zuweilen durch kürzere Behandlung mit 10proz. Salzsäurealkohol (6—10 Std.). Dann erhält man nach der Gramschen Färbung zuweilen ein rundes gramfestes Granulum in einzelnen Hefezellen. Doch war nicht mit Sicherheit zu entscheiden, ob dieses dem Makrogranulum oder den später zu besprechenden Sporenanlagen entspricht. Demnach muß ich die Frage, ob das Makrogranulum gramfest ist, vorläufig offen lassen.

Färbt man gramnegative Bakterienausstriche nach Gram und differenziert in Alkohol, so sind die Makrogranula nicht nachweisbar, wohl aber erhält man bei Nachbehandlung mit Tannin-Safranin die Mikrogranula als blauschwarze Pünktchen (vgl. Abschn. IV).

Ueber die funktionelle Bedeutung des Makrogranulums.

Wie oben auseinandergesetzt worden ist, läßt sich an den Hefezellen und an allen Bakterien ein isolierter Bestandteil des Zelleibs in Form des bisher als Makrogranulum bezeichneten Gebildes darstellen. Dieses Gebilde ist durch seine Lage im Zelleib und durch wohlbestimmte färberische Reaktionen als ein chemisch einheitlicher Körper aufzufassen (Phosphatid- bzw. Lezithin-Eiweißverbindung). Es drängt sich nun von selbst die Frage auf, welche Bedeutung dieses Granulum für die Bakterienzelle hat. Sein konstantes Vorkommen in jeder Bakterienzelle, sowie sein einheitlicher chemischer Bau spricht wohl mit großer Wahrscheinlichkeit dafür, daß es kein zufälliges Sekretionsprodukt (Saftvakuole, Reservestoffe) darstelle, vielmehr als ein integrierender Bestandteil des Bakteriums angesehen werden muß. Es liegt daher die Annahme nahe, daß wir es hier mit dem lange gesuchten „Kern“ der Bakterienzelle, also dem Zentrum des Lebens zu tun hätten. Für diese Annahme sprechen folgende Ueberlegungen: 1) Sein konstantes Vorkommen in jeder Bakterienzelle; 2) sein einheitlicher chemischer Bau; und 3) die Tatsache, daß der Teilung der Bakterienzelle eine Teilung des Makrogranulums vorausgeht, ein Vorgang, der sich bei lebhaft wachsenden Kulturen von Staphylo- und Streptokokken sehr schön beobachten läßt, bei denen die Kokken meist zwei, oft sogar vier Makrogranula enthalten.

Immerhin lassen sich gegen die Kernnatur dieses Gebildes einige Einwendungen machen, so z. B. das Fehlen einer bei der tierischen Zelle stets vorhandenen Kernmembran. Zur Klärung dieser Frage glaubte ich am besten beizutragen, wenn zum Vergleich ein Objekt herangezogen wurde, das einen Kern besitzt, nämlich die Amöben.

Nun läßt sich einwandfrei zeigen, daß man z. B. bei Heuamöben den bekannten Kern mit den gleichen Methoden wie bei der Hefe und den Bakterien darstellen kann: Nach Vorbehandlung der Amöbenausstriche mit 10proz. Salzsäure bei gewöhnlicher Temperatur läßt sich der Kern mit basischen Farbstoffen färben, z. B. nach der Karbolmethylenblau-Tannin-Safranin- oder Fuchsin-Tannin-Methylenblau-Methode (Fig. 11), wobei der äußere Rand blau und der Kern rot erscheint. Aber nicht nur in färberischer Beziehung ähnelt der Amöbenkern dem Makrogranulum, sondern er zeigt auch dieselben Löslichkeitsverhälnisse, und zwar: Unlöslichkeit in verdünnter Salzsäure, Schweizers Reagens, verdünnten Alkalien und Ammoniak, und Löslichkeit in Salzsäurealkohol. Demnach müssen wir wohl annehmen, daß auch die Amöben (wahrscheinlich auch andere

Protozoen) einen Kern besitzen, der ebenfalls aus einer Lipoideiweißverbindung besteht.

Mit dem chemischen Bau des Amöbenkerns hat sich bereits Unna (8) in einer Arbeit aus dem Jahre 1917 eingehend beschäftigt. Auf Grund seiner Färbbarkeit mit Hämatoxylinfarbstoffen faßte ihn Unna als ein basisches, also oxyphiles, in konzentrierter Salzsäure lösliches Eiweiß auf. Diese Auffassung stützte Unna vor allem darauf, daß das Hämatoxylin ein saurer Farbstoff sei, der also nur ein basisches Substrat färben könne. Die Unnasche Auffassung ist jedoch nicht aufrecht zu erhalten. Daß nämlich der Amöbenkörper einen sauren Körper enthält, ist ja durch seine Färbbarkeit mit allen basischen Farbstoffen (Karbolmethylenblau, Safranin, Fuchsin, Methylviolett usw.) leicht zu beweisen. Auf diesem sauren Körper (dem Kernlipoid) beruhen auch die Hämatoxylinfärbungen, denn nach Entfernung dieses sauren Lipoids durch Salzsäurealkohol läßt sich der Amöbenkern weder mit Hämatoxylin, noch mit basischen Farbstoffen mehr färben. Wie ich an anderer Stelle zeigen konnte (5), beruht die Färbung eines sauren Lipoids mit dem sauren Farbstoff Hämotoxylin darauf, daß in den gewöhnlichen Hämatoxylinfarbstoffen eine basische Beize (Alaun, Eisen) enthalten ist, die eine Tripelverbindung mit dem sauren Lipoid einerseits und dem sauren Farbstoff Hämatoxylin andererseits bildet. Der Mechanismus der Hämatoxylinfarbstoffe als Beizenfarbstoffe läßt sich einwandfrei dadurch beweisen, daß man die Färbungen in zwei Abschnitte zerlegt, nämlich in einer Beizung mit Alaun- oder Eisenverbindungen, und nach Wasserspülung Nachfärbung mit einer wässerig-alkoholischen Hämatoxylinlösung. Die letztere Lösung färbt nicht gebeizte Substrate überhaupt nicht, bzw. nur schmutzigbraun, während sie Zellen, die mit Alaun oder Eisen vorbehandelt worden sind, violett, bzw. schwarz färbt. Von Wichtigkeit für den chemischen Bau des Amöben- und Bakterienkerns ist es auch, darauf hinzuweisen, daß, wie sich leicht nachweisen läßt, auch Lezithinausstriche einerseits mit Böhmers Hämatoxylin (ebenso wie der Amöben- und der Hefekern), andererseits auch nach Alaunbeizung mit einer wässerig-alkoholischen Hämatoxylinlösung prächtig violett färben.

Am Amöbenkern läßt sich auch die basische Eiweißsubstanz, an die das saure Lipoid gebunden ist, mit sauren Farbstoffen nachweisen, z. B. mit Hilfe der Wasserblau-Tannin-Safraninmethode, wobei der Kern blau, Leib und äußere Membran rot erscheint (Fig. 12). Diese basische Eiweißgrundsubstanz, die in konzentrierter Salzsäure unlöslich ist, hat bereits Unna nachgewiesen.

Mit Rücksicht auf die gleichen färberischen und chemischen Eigenschaften des Makrogranulums der Hefe und Bakterien und des Amöbenkerns darf man wohl ersteres als den Kern der Bakterienzelle ansprechen. Zum Unterschied von dem später zu besprechenden Mikrogranulum möchte ich dieses als Makronukleus zu bezeichnen vorschlagen.

II. Theorie der Lipoidfärbungen.

Wie die Untersuchungen über die chemische Natur des Makronucleus der Bakterien ergeben haben, liegt hier eine Lipoideiweißverbindung vor, deren Lipoidbestandteil sich einerseits mit dem indifferenten Farbstoff Sudan, andererseits aber auch mit fast allen basischen Farbstoffen färben läßt. Zwischen diesen beiden Färbemethoden besteht jedoch ein grundlegender Unterschied. Während die Aufnahme des Sudans, das als indifferenter (Leonor Michaelis) Farbstoff überhaupt keine chemischen Affinitäten besitzt, sicher auf einem physikalischen Vorgang beruht, nämlich der Lösung des Sudans in einem Lipoid (oder Neutralfett), muß die Aufnahme der basischen Farbstoffe, also chemisch reaktionsfähiger Körper, aus wässerigen Lösungen als ein chemischer Prozeß aufgefaßt werden. Aus dieser Tatsache mußte mit Recht gefolgert werden, daß das in Frage stehende Lipoid ein saurer Körper sein muß. In der Tat zeigt ja, wie oben auseinandergesetzt wurde, reines Lezithin dieselben färberischen Reaktionen

einerseits gegenüber einer alkoholischen Sudanlösung, andererseits gegenüber wässerigen Lösungen basischer Farbstoffe.

Bei der Untersuchung über den chemischen Bau der Sporenanlagen stößt man, wie weiter unten gezeigt wird, auf eine andere Art von Lipoiden, die, wie z. B. Cholesterinester, gar keine sauren Eigenschaften besitzen und die deshalb in striktem Gegensatz zu dem sauren Lipoid Lezithin stehen. Von diesen chemisch nicht reaktionsfähigen Lipoiden sind die bekanntesten das Cholesterin und die Cholesterinester. Das erstere ist ein sekundärer Alkohol von noch nicht völlig bekannter Konstitution und sehr geringer chemischer Reaktionsfähigkeit. Die den Neutralfetten (Glyzerinester) entsprechenden Cholesterinester stellen in chemischem Sinne völlig neutrale Körper dar.

Aehnlich wie beim Lezithin wurden auch von den Cholesterinverbindungen Objektträgerausstriche hergestellt, um deren färberisches Verhalten zu analysieren. Zu diesem Zwecke wurde chemisch reines Cholesterin (Riedel) in Aether oder Chloroform gelöst und die Lösung auf Objektträger ausgestrichen. Das Lösungsmittel verdunstet ziemlich schnell und hinterläßt einen feinen weißen Belag, der auf der Unterlage haften bleibt. Viel einfacher gelingt es, Ausstriche der Cholesterinester herzustellen. Wir verwandten Adeps lanae anhydricus, das bekanntlich aus fast reinen Cholesterinestern besteht. Diese weiche, schwach gelblich gefärbte Masse läßt sich sehr leicht auf Objektträger ausstreichen.

Was nun das färberische Verhalten betrifft, so nehmen Cholesterin und Cholesterinester basische Farbstoffe im allgemeinen nicht auf, nicht einmal Ziehlsche Lösung, selbst beim Aufkochen. Ein anderes Resultat war auch auf Grund des neutralen bzw. chemisch wenig reaktionsfähigen Charakters dieser Lipoide von vornherein nicht zu erwarten. Hingegen färben sich Cholesterinesterausstriche mit Sudan schön gelbrot bis braunrot; Cholesterinausstriche nehmen aber nur wenig Sudan auf, vielleicht aus dem Grunde, weil es sich in kristallinischem Zustand auf dem Objektträger befindet.

Einer besonderen Besprechung bedarf von den basischen Farbstoffen das Nilblausulfat, das in 1proz. wässeriger Lösung in unseren Versuchen die Cholesterinesterausstriche ganz schwach rosa anfärbte. (Cholesterin färbte sich hierbei auch nicht.) Dieser Farbstoff wird bekanntlich seit Lorrain Smith zum Nachweis der Neutralfette benutzt, die sich durch eine wässerige Lösung dieses Farbstoffes kräftig rot färben. Die metachromatische Färbung der Glyzerinester durch das blaue Nilblausulfat ist, wie wohl allgemein bekannt sein dürfte, darauf zurückzuführen, daß die freie Base des Nilblaus (erhalten durch Zusatz von Natriumlauge oder Soda) rot gefärbt ist, in Wasser unlöslich, aber in Alkohol gut löslich ist. Die Rotfärbung der Neutralfette durch Nilblau rührt also daher, daß sie aus der wässerigen Lösung des Nilblausulfats die freie rote Base, die in geringen Mengen in ihr enthalten ist, aufnehmen. Wenn aber die neutralen Cholesterinester durch denselben Farbstoff nur ganz schwach gefärbt wurden, so konnte diese Erscheinung darauf beruhen, daß die rote Base nur in sehr geringer Konzentration in der wässerigen Lösung des Nilblausulfats enthalten ist. War diese Annahme richtig, so mußte es möglich sein, auch die Cholesterinester rot zu färben, sobald man eine Farbstofflösung verwendet, die die freie

Nilblaubase in großen Mengen enthielte. Das ist in der Tat der Fall.

Auf Grund dieser Ueberlegungen wurde von uns folgende Lösung hergestellt:

1proz. wässerige Nilblausulfatlösung.
Alkohol abs. āā 25,0,
n-Natronlauge 5—10 Tropfen bis zur Rotfärbung.

Diese Lösung ist, frisch hergestellt, prächtig purpur- bis blutrot gefärbt. Sie ist äußerst unbeständig. Bei Berührung mit der Luft wird sie schnell blau, wahrscheinlich entsteht durch Aufnahme von Kohlensäure aus der Luft Nilblaukarbonat, also das basische Farbsalz. Nach einigen Stunden fällt aus der oben genannten Lösung ein dunkelbrauner Niederschlag aus. Die Lösung muß also unmittelbar vor der Färbung jedesmal frisch hergestellt und sofort gebraucht werden.

Läßt man die Lösung der Nilblaubase, nach den obigen Angaben hergestellt, auf einen Cholesterinesterausstrich einige Minuten einwirken und spült kurz mit 50proz. Alkohol und dann mit Wasser ab, so erscheint der Ausstrich prächtig und intensiv rot gefärbt. Färbt man hingegen damit einen Lezithinausstrich, so erscheint er nach dem Abgießen rot, wird aber beim Abtrocknen rasch blau.

Diese interessante Erscheinung beweist eindeutig, daß das Lezithin als saures Lipoid mit der roten Nilblaubase eine salzartige Verbindung eingeht und deshalb blau gefärbt erscheint. Wir besitzen demnach in der oben angegebenen Lösung der Nilblaubase ein vorzügliches Unterscheidungsmittel und Reagens auf neutrale und saure Lipoide: Erstere färben sich rot, letztere blau.

Da die Färbung mit der soeben genannten Nilblaubase nicht immer gelingt, infolge der geringen Beständigkeit ihrer Lösung, so wurde nach einer anderen Methode gesucht, die ebenfalls die färberische Unterscheidung zwischen neutralen und sauren Lipoiden gestattet. Wie oben bereits ausgeführt wurde, nehmen diese beiden Lipoide den Fettfarbstoff Sudan auf, dagegen werden basische Farbstoffe nur von den sauren Lipoiden aufgenommen. Eine gleichzeitige Färbung der neutralen und sauren Lipoide in zwei Kontrastfarben erhält man daher, wenn man die mit Sudan gefärbten Ausstriche mit Karbolmethylenblau nachfärbt: dann erscheinen die neutralen Lipoide rot gefärbt, dagegen die sauren blau, und zwar durch Aufnahme des dunklen basischen Farbstoffes, der die vorausgegangene helle Sudanfärbung verdeckt.

III. Nachweis und chemischer Bau der Sporenanlagen.

Die färberische Darstellung dieser bei der Hefezelle und den sporenbildenden Bakterien vorkommenden Zelleinschlüsse gelingt am sichersten an Material, das kurze Zeit mit verdünnter heißer Salzsäure behandelt worden ist (Abbaustadium II). Eine Verwechslung mit dem Makronucleus ist dann ausgeschlossen, weil der Kern durch diese Vorbehandlung (vgl Abschn. I) zerstört worden ist. Färbt man nun z. B. einen solchen Hefeausstrich mit basischen Farbstoffen, z. B. Safranin, Rhodulinviolett, polychrom. Methylenblau oder Karbolmethylenblau (bei letzterem empfiehlt es sich, die Farblösung zu erwärmen), so erkennt man in zahlreichen — nicht in allen — Hefezellen mehrere 2—5 kreisrunde rote bzw. blaue Ringe, deren Zentrum ungefärbt erscheint (vgl. Fig. 13).

Diese Ringe stellen die äußere Hülle der hier zu besprechenden Sporenanlagen dar. Ihre färberische Darstellung gelingt auch mittels Tanninbeize und Nachfärbung mit basischen Farbstoffen.

Technik. Ein Hefeausstrich (Abbaustad. 2) wird 5 Min. mit 30proz. Tannin gebeizt, abgespült und 1—2 Min. mit Fuchsin nachgefärbt: Die Membranen der Sporenanlagen sind als rote runde Kreise mit hellem Zentrum sichtbar.

Doppelfärbungen erhält man, wenn man mit einem sauren Farbstoff (Guineagrün, Eosin) kurz vorfärbt und nach Tanninbeizung mit basischen Farbstoffen (Fuchsin, bzw. Methylviolett) nachfärbt, z. B. nach den an anderer Stelle beschriebenen Guineagrün-Tannin-Fuchsin- und Eosin-Tannin-Methylviolettmethoden [vgl. Fig. 21 u. 22 der oben genannten Arbeit (5)]. Ebenso lassen sie sich mit sauren Farbstoffen substantiv, also ohne Beizung, färben, z. B. nach der Pikrinsäure-Kongorotmethode, wobei der Zelleib gelb, das Ektoplasma und die Vorsporenmembran rötlich erscheinen (Fig. 20 ders. Arbeit).

Im Gegensatz zu der Membran läßt sich das Zentrum der Sporenanlage weder mit sauren noch mit basischen Farbstoffen färben. Selbst beim Aufkochen eines Hefeausstriches (Stad. II) mit Ziehlscher Lösung und kurzer Abspülung mit Essigsäure, zur Beseitigung der Niederschläge und der Ueberfärbung, erscheinen nur die Membranen intensiv rot gefärbt, während das Zentrum der Sporenanlagen den Farbstoff nicht aufgenommen hat.

Dieses ablehnende Verhalten des Innenkörpers der Sporenanlagen gegenüber basischen und sauren Farbstoffen läßt die Annahme berechtigt erscheinen, daß hier ein neutrales Lipoid vorliegen dürfte. In der Tat gelingt es sehr leicht, diese Einschlüsse der Hefezellen mit Sudanlösung zu färben, wobei auch ihre äußere Membran sich oft mitfärbt (Fig. 10).

Nachdem durch diese Untersuchung an den Hefezellen des eingangs erwähnten zweiten Abbaustadiums die Existenz und die Charakterisierung dieser besonderen Zelleinschlüsse gelungen waren, wurde versucht, die letzteren auch an den Objektträgerausstrichen des Abbaustadiums I, die noch den Makronukleus enthalten, isoliert oder in einer Kontrastfarbe zum Kern zur Darstellung zu bringen. Nach der oben erörterten Theorie der Lipoidfärbungen und den dort beschriebenen Färbemethoden gelingt es daher, Makronukleus und Spoorenanlagen der Hefezellen gleichzeitig in zwei Kontrastfarben darzustellen, und zwar mittels der Sudan-Karbolmethylenblaumethode.

Technik. Ein Hefeausstrich (Stad. I) wird 15—20 Min. in einer Kuvette mit Sudanlösung nach Ciaccio (80proz. Alkohol 95, Azeton 5, Sudan bis zur Sättigung) gefärbt, kurz mit 50proz. Alkohol und dann mit Wasser abgespült und mit Karbolmethylenblau ca. 1 Min. nachgefärbt. Abspülung, Trocknung, Glyzerin, Deckgläschen.

Der Hefekern ist nach dieser Methode blau gefärbt, die Sporenanlagen gelbrot. Die reifen, fertigen Sporen weisen im Gegensatz zu den Sporenanlagen eine Doppelfärbung auf, und zwar erscheinen sie selbst blau gefärbt mit deutlicher Markierung einer Membran, und enthalten außerdem im Innern ein dunkelblau hervortretendes Granulum (Kern) und ein zweites, rotes von verschiedener Größe. Außerdem enthalten sie zwischen den einzelnen, in einer Kapsel befindlichen Sporen größere rotgefärbte Massen und außerdem oft eine schmale rote Schicht, die die einzelnen Sporen mehr oder minder vollständig umgibt oder einschließt (Fig. 14).

Ebenso gestattet die Nilblaubasemethode eine simultane Färbung der sauren und neutralen Lipoide der Hefezellen in zwei Kontrastfarben.

Technik. Ein Hefeausstrich (Stad. I) wird in einer Kuvette mit einer frisch bereiteten Lösung der Nilblaubase (vgl. Abschn. II) ca. 15—30 Min. gefärbt, kurz mit 50proz. Alkohol abgespült. Der Ausstrich erscheint jetzt rötlich gefärbt. Spült man jetzt mit Wasser ab, so wird er blau, und die Blaufärbung verstärkt sich noch, wenn er einige Minuten frei an der Luft liegen bleibt. Einbettung in Glyzerin und Deckgläschen.

Die Sporenanlagen erscheinen prächtig rot gefärbt, oft von einer blauen Membran umgeben. Der Zelleib ist heller blau gefärbt saures Endolipoid). Zuweilen zeigen die so gefärbten Präparate auch den Kern der Hefezellen als dunkelblau gefärbtes Granulum. In vereinzelten Fällen war auch das Ektoplasma distinktblau gefärbt (Ektolipoid), besonders nach kurzer Nachbehandlung mit Essigsäure, wobei aber die Färbung der Sporenanlagen zum Teil abgenommen, zum Teil ganz verschwunden war. Sehr schöne Bilder liefern auch die reifen Sporen: eine äußere rote Schicht, die auch zwischen den einzelnen Sporen in größerer Menge enthalten ist. Die blauen Sporen enthalten im Innern ein rotes Granulum (neutrales Lipoid, Fig. 15).

Es verdient besonders betont zu werden, daß sowohl die Sudankarbolmethylenblau- als auch die Nilblaubasemethode im wesentlichen zu denselben Resultaten hinsichtlich des Baues der Sporenanlagen und der reifen Sporen führen.

Was nun die chemische Natur des Innenkörpers der Sporenanlagen betrifft, so geht aus den bisherigen Versuchen eindeutig hervor, daß es sich um einen neutralen Körper handeln muß. Es könnte sich demnach entweder um Neutralfett (Glyzerinester), Cholesterinester oder freies Cholesterin handeln. Gegen das Vorliegen eines Neutralfettes spricht die Tatsache, daß diese Innenkörper bei einer Färbung mit wässerigem Nilblausulfat ungefärbt erscheinen, wogegen Glyzerinester sich, wie wir seit Lorrain Smith wissen, rot färben müßten. Freies Cholesterin dürften die Sporenanlagen deswegen nicht enthalten, weil ersteres mit der Nilblaubase sich nur schlecht bzw. gar nicht färbt, wie im Abschnitt II dargelegt worden ist. Wir kommen daher per exclusionem zu der Anschauung, daß die Sporenanlagen Cholesterinester enthalten dürften.

Der Nachweis einer Cholesterinverbindung in den Hefezellen läßt sich auch makrochemisch führen. Extrahiert man nämlich eine größere Quantität Hefe, die mit 2proz. Salzsäure 20 Min. gekocht worden ist, statt mit Alkohol allein mit Alkohol und Benzin āā, indem man das Filtrat mit diesen Lösungsmitteln aufnimmt und 24—48 Min. in den Schüttelapparat stellt, so erhält man nach dem Sedimentieren zwei Flüssigkeitsschichten, eine untere, ungefärbte Alkohol-, und eine obere, gelblich gefärbte Benzinschicht, die sich mittels Scheidetrichters gut voneinander trennen lassen. Nach dem Verdunsten der Benzinfraktionen erhält man eine gelblich gefärbte ölige Flüssigkeit; mit dieser öligen Substanz gelingt es nach der Salkowskischen Methode, eine positive Cholesterinreaktion zu erhalten: eine kleine Menge dieser öligen Flüssigkeit wird in Chloroform gelöst und mit den gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure zersetzt und geschüttelt: die Chloroformschicht erscheint braunrot gefärbt.

Löst man ein erbsengroßes Stück von Lanolin, das bekanntlich aus fast reinen Cholesterinestern besteht, in Chloroform, so erhält man mit konzentrierter Schwefelsäure dieselbe Salkowskische braunrote Farbenreaktion. Stellt man dagegen diese Probe mit chemisch reinem Cholesterin (Riedel) an, so erscheint die Chloroformschicht blutrot gefärbt. Demnach scheint auch diese Tatsache dafür zu sprechen, daß die Sporenanlagen Cholesterinester enthalten.

Die Innenkörper der Sporenanlagen enthalten demnach ein neutrales Lipoid, das als Cholesterinesterverbindung zu charakterisieren ist. Im Gegensatz zum Innenkörper besteht die Membran der Sporenanlagen aus einer Lipoideiweißverbindung, deren saurer Lipoidbestandteil durch basische Farbstoffe (polychr. Methylenblau, Karbolmethylenblau, Safranin usw.) nachgewiesen werden konnte. Die basische Grundsubstanz kann ebenso wie das Ektoplasma durch saure Farbstoffe (Pikrinsäure-Kongorotmethode) oder mittels Tanninbeizung und Nachfärbung mit basischen Farbstoffen ermittelt werden.

Die an der Hefezelle des zweiten Abbaustadiums mit den soeben genannten Methoden nachweisbare Membran der Sporenanlagen stellt jedoch nicht die gesamte äußere Hülle dieser Zelleinschlüsse dar. Vielmehr läßt sich die dickere Membran wahrscheinlich machen, und zwar durch eine Färbemethode, die von Eisenberg angegeben worden ist.

Zum Nachweis von Fett in der Bakterienzelle hat Eisenberg (10) ein Verfahren angegeben, das der Gramschen Methode nachgebildet ist. Die Objektträgerausstriche werden 3—5 Min. mit Viktoriablau B (1proz. wässerige Lösung) gefärbt, abgespült, mit Lugolscher Lösung 1—2 Min. nachbehandelt. Nach dem Abgießen werden die Ausstriche mit Nicolles Aceton Alkohol āā so lange differenziert, bis keine Farbstoffmolken mehr abgehen, dann mit Wasser abgespült und mit verdünnter Ziehlscher Lösung (1:10) ca. 1 Min. nachgefärbt. Dabei sollen nach Eisenberg die Fetteinschlüsse blauschwarz, der Rest der Bakterienzellen rot erscheinen (10).

Färbt man nun einen Hefeausstrich (Abbaustad. I) nach Eisenberg mit Viktoriablau-Lugol-Aceton-Alkohol und behandelt dann mit Tannin-Safranin nach, so zeigen die Hefezellen ein rotes Ektoplasma und enthalten im Leib mehrere (2—5) blauschwarze große Granula mit hellem Zentrum und dicker Membran. Sie entsprechen den Sporenanlagen, während der Kern nach dieser Methode ungefärbt erscheint (Fig. 16a). Daß der Kern nach der Eisenbergschen Methode nicht dargestellt wird, läßt sich sehr leicht beweisen, wenn man nach der Originalmethode vorgeht und statt mit Tannin-Safranin mit verdünnter Ziehlscher Lösung nachfärbt: Dann sind die Sporenanlagen blauschwarz, der Zelleib rötlich und der Kern dunkelrot gefärbt.

Obgleich bei der Eisenbergschen Methode die Sporenanlagen in großer Ausdehnung gefärbt erscheinen, so lehrt eine einfache Ueberlegung, daß nur deren Membran die Farbe angenommen haben kann. Denn der Innenkörper nimmt ja, wie oben auseinandergesetzt worden ist, basische Farbstoffe, selbst Karbolfuchsin, in der Hitze nicht auf. Demnach kann er auch das Viktoriablau nach der Eisenbergschen Methode nicht aufgenommen haben. Die scheinbare Färbung fast der ganzen Sporenanlage wird nur durch die Dicke der Membran vorgetäuscht. Im Abschnitt VI wird gezeigt werden, daß ähnliche Verhältnisse bei den reifen Sporen vorliegen, deren Darstellung mit den üblichen Methoden (karbolhaltigem basischen Farbstoff in der Hitze)

ebenfalls nur darauf beruht, daß die Membran den betreffenden Farbstoff aufnimmt.

Die intensive Färbung der Sporenanlagen nach Eisenberg dürfte demnach durch eine Doppelmembranbildung bedingt sein. Das wird dadurch bewiesen, daß nach Vorbehandlung mit heißer 2proz. Salzsäure (Abbaustad. 2) die Färbung nach Eisenberg nicht mehr gelingt, wohl aber sich trotzdem mit anderen Methoden noch eine, allerdings schmälere Membran färben läßt. Mithin muß hieraus geschlossen werden, daß durch diese Vorbehandlung die äußere Membran gelöst worden ist.

Auch diese äußere Membran der Sporenanlagen besteht aus einer Lipoideiweißverbindung, da sie in 10proz. Salzsäure bei gewöhnlicher Temperatur unlöslich (kein Nukleoproteid) und sich mit dem basischen Farbstoff Viktoriablau B färbt. Daß kein freies Lipoid vorliegt, geht daraus hervor, daß sie in Alkoholäther unlöslich ist.

Nachdem zuerst an der Hefezelle die färberische Darstellung und der chemische Bau der Sporenanlagen ermittelt worden ist, konnten dieselben Zelleinschlüsse auch beim B. anthracis aufgefunden werden. Ebenso wie bei der Hefe erscheinen beim Anthrax die Vorsporen als helle, meist runde, ungefärbte Lücken im Bakterienleib. Es muß jedoch hier bemerkt werden, daß bei Färbung mit basischen, selbst karbolhaltigen Farbstoffen bei gewöhnlicher Temperatur nicht alle Lücken von den Sporenanlagen herrühren. Zum Unterschied von den Hefezellen gibt es nämlich bei den Anthraxbakterien neben den freien reifen Sporen noch die in den Mutterbakterien befindlichen Innensporen. Diese Innensporen verhalten sich in färberischer Beziehung und bezüglich ihres chemischen Baues wie die reifen Sporen. Während aber Hefesporen (des Abbaustad. 1) mit Karbolmethylenblau ohne Erhitzen sich glatt färben (vgl. oben), zeigen die Anthraxsporen ein anderes Verhalten, insofern als sie auch nach einer solchen Vorbehandlung nur durch Färbung mit basischen Farbstoffen (Karbolmethylenblau, Ziehlscher Lösung) in der Hitze sich tingieren lassen. Diese Eigentümlichkeit kommt sowohl den freien als auch den Innensporen zu. Färbt man nun einen solchen Milzbrandausstrich (Abbaustad. 1) mit Karbolmethylenblau heiß ca. 3 Min. und behandelt mit Tannin-Safranin nach, so erkennt man in den Stäbchen, die ein rotes Ektoplasma zeigen, viele runde helle Lücken von verschiedener Größe. Sie zeigen eine äußere dunkle Begrenzungslinie. Daneben sieht man in einzelnen Stäbchen die Innensporen mit blauem, meist ovalem Zentrum von einem hellen Hof umgeben, deren äußere Begrenzungslinie mit dem Bakterienektoplasma zusammenfällt (Fig. 28). Die Sporenanlagen zeigen oft an ihrer äußeren Begrenzungslinie ein kleines Mikrogranulum, dessen Bau im nächsten Abschnitt besprochen wird. Da die Sporenanlagen, die zuweilen die ganze Breite des Bakteriums einnehmen, basische Farbstoffe und ebenso saure, selbst beim Erhitzen nicht aufnehmen, so mußten sie ebenfalls einen neutralen Körper, wahrscheinlich ein neutrales Lipoid, enthalten.

Jedoch gelingt es mit Hilfe der oben beschriebenen Nilblaubase-Methode nur selten, eine Rotfärbung der Sporenanlagen zu erzielen. Auch mit alkoholischer Sudanlösung war meistens eine Färbung nicht zu erzielen. Dagegen führte eine Modifikation zum Ziele, bei der die Nilblaubase in statu nascendi auf den Milzbrandausstrich einwirkte.

Technik. Auf einen Milzbrandausstrich (Abb. Stad. 1) wird eine 1proz. Nilblausulfatlösung, der eine geringe Menge Alkohol hinzugesetzt worden ist, gebracht, dann

werden einige Tropfen einer n. Natronlauge aufgegossen. Es entsteht eine ziegelrote trübe Lösung, die man etwa 10—15 Min. einwirken läßt. Wasserspülung, Trocknen. Untersuchung in Glyzerin mit Deckgläschen. Die Sporenanlagen erscheinen prächtig rot gefärbt, oft von einer blauen Membran umgeben, meistens mit einem kleinen, dunkler gefärbten Mikrogranulum am Rande. Der Rest der Stäbchen einschließlich Ektoplasma ist dunkelblau gefärbt (saure Lipoide). Die freien und Innensporen zeigen eine schmale Membran und ein helles Zentrum (Fig. 17).

Ebenso wie bei der Hefe lassen sich auch beim Milzbrand die Sporenanlagen nach Eisenbergs Methode in blauschwarzer Farbe darstellen (Fig. 16b). Die Färbung gelingt aber nicht in allen Fällen, wahrscheinlich aus dem Grunde, weil die Sporenanlagen nicht immer eine dicke Membran besitzen, auf deren Färbung die Eisenbergsche Methode beruht. Dagegen erscheinen sie, solange sie nur die Innenmembran aufweisen, nach der Eisenbergschen Methode als schwach bläuliche Körper.

Ich möchte noch an dieser Stelle ausdrücklich betonen, daß die Sporenanlagen unabhängig vom Zellkern entstehen, wie Fig. 14 deutlich erkennen läßt, wobei beide Zellbestandteile nebeneinander dargestellt sind.

IV. Nachweis und chemischer Bau der Mikrogranula.

Am einfachsten gelingt die Darstellung dieser dritten Art der Bakterieneinschlüsse an Objektträgerausstrichen des eingangs erwähnten dritten Abbaustadiums, d. h. durch Nachbehandlung der mit 2proz. Salzsäure kurze Zeit gekochten Bakterien der Hefezellen mit 10proz. Salzsäurealkohol. An diesen lipoidfreien Zellen färben basische Farbstoffe wie Karbolmethylenblau, Fuchsin, Safranin usw. nur ein kleines punktförmiges Gebilde. An den Hefezellen ist dieses Mikrogranulum bereits an anderer Stelle abgebildet worden (vgl. Figg. 13—18 in Ektoplasma der Bakterien 3, 4). Ebenso erhält man die Mikrogranula mit basischen Farbstoffen, wenn man die hitzefixierten Hefeausstriche direkt einer Vorbehandlung mit 10proz. Salzsäurealkohol unterwirft (vgl. Tab. II).

Morphologie.

Hefe.

Die Mikrogranula liegen meist exzentrisch zum Zelleib. Zuweilen sieht man zwei Mikrogranula, die anscheinend durch Teilung entstanden sind. Nicht selten befinden sie sich am Rande der Zelle. Ziemlich oft sind sie von einem hellen, breiten Hof umgeben, der wohl den Sporenanlagen entspricht, so daß auch die Vorsporen Mikrogranula besitzen (vgl. Fig. 2: Mikrogranula der Sporenanlagen metachromatisch rot gefärbt). Bei eingehender mikroskopischer Betrachtung gewinnt man oft den Eindruck, daß das Mikrogranulum den äußeren Teil des Kernes der Hefezelle bildet.

Milzbrand.

Die Mikrogranula liegen entweder zentral zum Zelleib, wo sie anscheinend einen Teil des Kernes bilden oder den Sporenanlagen angehören, oder interbazillär, d. h. an der Berührungsstelle zweier Stäbchen oder endlich an der Peripherie der Längsseite des Bakteriums. Die Sporenanlagen zeigen oft ein solches Mikrogranulum am

Rande. Ebenso befindet es sich an der Peripherie der freien und der Innensporen.

Kugelbakterien (Staphylo-, Pneumococcus, Gonococcus): Das Mikrogranulum liegt gewöhnlich am Rande, d. h. am Ektoplasma. Zuweilen weisen zwei in Teilung begriffene Kokken nur ein Mikrogranulum auf. Selten liegt es innerhalb des Ektoplasmaringes, aber ebenfalls exzentrisch und nahe dem Rande.

Stäbchenformen (Diphtherie, Proteus): Die Mikrogranula liegen gewöhnlich an den Polen, zuweilen aber auch in der Mitte des Stäbchens, meist exzentrisch und nahe dem Ektoplasma. Speziell bei den Diphtheriestäbchen scheinen sie mit den bekannten Polkörnern zusammenzufallen, von denen sie nur einen Teil bilden.

Darstellungsmethoden.

1) Mit basischen Farbstoffen nach Vorbehandlung mit Salzsäurealkohol, z. B. an der Hefezelle (vgl. oben).

2) Nach gleicher Vorbehandlung mittels der Gramschen Färbung, z. B. nach der Methode Gram-Tannin-Safranin [Hefe: vgl. Fig. 16 der oben zitierten Arbeit (5) und Milzbrand: Fig. 18 dieser Tafel].

3) Nach Salzsäurevorbehandlung (Stad. 1) färben sie sich nach der Methode Karbolmethylenblau-Tannin-Phosphin metachromatisch rot (Fig. 8). Ebenso bei Karbolmethylenblau-Anilin-Phosphin (Fig. 26).

4) Mit Polychrom-Methylenblau färben sie sich ebenfalls rot (Fig. 2, 13).

5) Nach der Eisenbergschen Methode und anschließender Behandlung mit Tannin-Safranin erscheinen sie als kleine punktförmige schwarze Gebilde (vgl. Fig. 16a, b), wo sie sich durch ihre Kleinheit von den Sporenanlagen recht gut unterscheiden lassen.

6) An einzelnen grampositiven unvorbehandelten Bakterien, z. B. Diphtherie, stellt die Eisenberg-Tannin-Safranin-Methode nur die Mikroogranula dar (Fig. 19).

7) An den gramnegativen Bakterien erhält man an unvorbehandelten Ausstrichen die Mikrogrannula als kleine schwarze Pünktchen, wenn man die nach Gram gefärbten Ausstriche mit Alkohol differenziert, mit konzentriertem Tannin 2—3 Min. nachbehandelt und mit Safranin 1—2 Min. nachfärbt, z. B. Gonococcus (Fig. 20), Proteus (Fig. 21).

Chemischer Bau.

Das Mikrogranulum gehört, abgesehen von der basischen Eiweiß-Grundsubstanz, die nur in konzentrierten Laugen in der Hitze löslich ist, zu den widerstandsfähigsten Teilen der Zelle. Selbst durch 10proz. Salzsäurealkohol wird es trotz 24—48std. Einwirkung nicht zerstört. Sein chemischer Bau läßt sich folgendermaßen charakterisieren: Es besteht aus einem sauren, eisenhaltigen, gramfesten Lipoid, das an ein Eiweiß gebunden ist.

Sein saurer Charakter wird dadurch bewiesen, daß es sich mit basischen Farbstoffen färben läßt (vgl. oben). Die Gramfestigkeit beweist seinen lipoiden Charakter, da wir heute wissen, daß die Gramsche Färbung auf einem sauren Lipoid beruht [vgl. Ektoplasma der Bakterien 2 (11) und 3—4 (5)]. Noch zwingender läßt sich der Lipoidgehalt des Mikrogranulums dadurch beweisen, daß es sich mit Sudan färbt.

An der lipoidfreien Hefezelle (Stad. 3) erscheinen nach Sudanfärbung die Mikrogranula gelbrot gefärbt (Fig. 22). Auch das Mikrogranulum der Milzbrandsporen färbt sich sehr leicht mit Sudan.

Da das Mikrogranulum in Alkohol, Aether usw. unlöslich ist, so kann es kein freies Lipoid enthalten; vielmehr muß seine Lipoidkomponente an einen basischen Körper gebunden sein. Diese basische Grundsubstanz (Eiweiß) läßt sich auch direkt nachweisen, und zwar durch Färbung mit dem sauren Farbstoff Guineagrün (vgl. Fig. 23: Mikrogranula des Milzbrandbakteriums dunkelgrün, Leib hellgrün). Für die Hefezelle ist dieser Nachweis bereits an anderer Stelle geliefert [vgl. Fig. 22 in Ektoplasma der Bakterien 3—4 (5)]. Auch das Mikrogranulum der Milzbrandsporen läßt sich in gleicher Weise färben, z. B. mittels Guineagrün-Tannin-Safranin: Fig. 23a Membran rot, Mikrogranula grün.

Von sehr großem theoretischen Interesse ist die Tatsache, daß das Mikrogranulum mikrochemisch nachweisbares Eisen enthält. Der Nachweis geschieht mittels der bekannten Berliner-Blaureaktion und gelingt sowohl an den unvorbehandelten wie auch an den vorbehandelten Hefeausstrichen.

Technik. Die Hefeausstriche werden 24 Std. in einer Kuvette mit Schwefel-Ammonium behandelt, nach der Herausnahme mit Aqu. dest. gründlich abgespült und dann in einer frisch bereiteten Lösung von 20proz. Ferrizyankalium und 1proz. Salzsäure zu gleichen Teilen übergossen. Die Einwirkungsdauer beträgt etwa 20 bis 30 Min. Die Objektträger werden nochmals mit Aqu. dest. abgespült und mit einer Kongorotlösung 1:1000 kurz nachgefärbt. In dem schwachrötlichen Leib erscheinen die Mikrogranula als dunkelblaue Pünktchen (Fig. 24). In einzelnen Fällen sieht man zuweilen auch größere blaue Massen, die vielleicht dem Makrogranulum oder der Membran der Sporenanlagen angehören.

Bei der Anstellung der Berliner Blaureaktion dürfen keine Reagentien verwandt werden, die evtl. mit Spuren von Eisen verunreinigt sind. Daher darf nur mit Aqua dest. nachgespült werden. Uebrigens erhält man ohne Schwefel-Ammonium-Vorbehandlung mit einer Ferrozyankalium-Salzsäurelösung ebenfalls oft eine Blaufärbung der Mikrogranula, doch ist die Färbung weniger intensiv und regelmäßig.

Bei guter Technik gelingt es, den Eisennachweis auch an den kleineren Bakterien, z. B. in Milzbrandstäbchen, zu erbringen. Doch darf bei diesen Mikroben die Nachfärbung mit Kongorot nur äußerst kurz erfolgen, da sonst die winzigen blauen Pünktchen leicht verdeckt werden. Noch besser ist es, jede Nachfärbung zu unterlassen. Allerdings bedarf es dann einer sehr großen Uebung, um die ungefärbten Stäbchen unter dem Mikroskop bei starker Lichtabblendung aufzufinden (Fig. 25).

Schließlich möchte ich zur Charakterisierung der Mikrogranula noch anführen, daß sie die Indophenolblausynthese geben.

Eine Oese frischer Hefe oder lebender Anthraxbakterien wird mit einigen Tropfen einer 1proz. Lösung von Dimethylparaphenylendiamin auf einen Objektträger verrieben und dann einige Oesen von α-Naphtol in 1proz. Sodalösung zugesetzt. Nach einigen Minuten erscheinen die Mikrogranula, unter dem Mikroskop, nach Auflegen eines Deckgläschens betrachtet, blau gefärbt. Der Rest der Zellen ist farblos.

Das Mikrogranulum ist demnach als wohl charakterisierter Bestandteil jeder Bakterienzelle zu bezeichnen. Der mikrochemisch geführte Nachweis, daß diese Zelleinschlüsse Eisen enthalten, scheinen mit von grundlegender theoretischer Bedeutung zu sein. Ueberhaupt ist die Tatsache, daß die Bakterien regelmäßig Eisen enthalten, bisher völlig unbekannt gewesen. Wohl hat man in sogen. Eisenbakterien (Cladothrix, Crenothrix) dieses Metall nachgewiesen [vgl. Lehmann (12)]. Doch handelt es sich hierbei um einen zufälligen Bestandteil

dieser Mikroben, die das im Aufenthaltsmedium sich vorfindende Eisen neben anderen Stoffen aufnehmen. Der Gehalt dieser Mikroben an Ferrum ist in Parallele zu setzen mit den in vereinzelten Fällen aufgefundenen Schwefel- und Manganverbindungen in den Bakterien, die allgemein ebenfalls als ein zufälliger Bestandteil der betreffenden Mikroben aufgefaßt werden. In striktestem Gegensatz zu den sogen. Eisenbakterien steht der hier zum erstenmal geführte Nachweis von Eisen in Form eines kleinen punktförmigen Körnchens in der Hefe- und Bakterienzelle. Daß hier kein zufälliges Resorptionsprodukt vorliegt, geht schon daraus hervor, daß das Metall regelmäßig in einem chemisch einheitlichen Körper (Lipoideiweißverbindung), dem Mikrogranulum, vorkommt. Wenn man sich ferner vergegenwärtigt, daß dieses Granulum unter sämtlichen sauren Körpern (Lipoiden) der Bakterienzelle am widerstandsfähigsten ist, daß es selbst einer längeren Behandlung mit Salzsäurealkohol widersteht, so muß man zu der Vorstellung gelangen, daß es einen wesentlichen Bestandteil des Bakteriums bildet. Ein weiteres Moment, das für die besondere Bedeutung des Mikrogranulums spricht, ist die Tatsache, daß es auch in den Sporen, ja selbst schon in den Sporenanlagen sich vorfindet. Mit Rücksicht darauf, daß es die Indophenolblausynthese gibt, dürfte die Vermutung nicht von der Hand zu weisen sein, daß es oxydative Funktionen im Leben der Bakterienzelle zu erfüllen hat, also die Zelle mit aktiviertem Sauerstoff zu versehen.

Ueber die Bedeutung des Mikrogranulums der Bakterien scheint mir ein Vergleich mit der tierischen Zelle einen gewissen Hinweis zu geben. Bekanntlich hat Macallum (13) Eisen im Kern und Kernkörperchen (Nukleolus) der tierischen Zellen nachweisen können. Diese Tatsache bestärkt mich in der Annahme, daß wir im Mikrogranulum der Bakterien das Analogon des Kernkörperchens der tierischen Zelle zu erblicken haben. In Anlehnung an die bei den Protozoen übliche Bezeichnungsweise möchte ich daher vorschlagen, das regelmäßig nachweisbare Mikrogranulum als Mikronukleus (Nucleolus) zu bezeichnen.

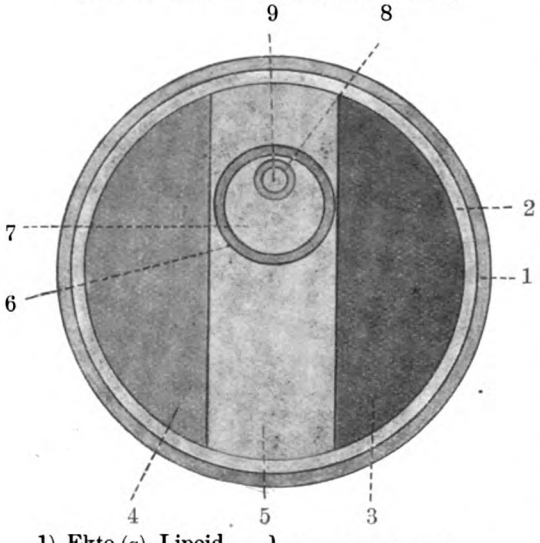
An dieser Stelle möchte ich noch auf eine Arbeit von Preisz (11) über den Bau der Milzbrandbakterien eingehen. Dieser Autor unterscheidet Kerne, säurefeste Körper und metachromatische Substanz. Obgleich Preisz seine Ergebnisse mit anderen Färbemethoden erzielt hat, die nicht immer eine mikrochemische Diagnose gestatten, insbesondere, da nichts über die Löslichkeitsverhältnisse dieser Zelleinschlüsse angegeben ist, so scheint mir aus seinen Abbildungen folgendes hervorzugehen: die von ihm als Kerne bezeichneten Gebilde sind mit unseren Mikrogranula identisch. Die säurefeste Substanz dürfte den Makrogranula entsprechen, die, wie im Abschn. I ausgeführt worden ist, die Färbung trotz Differenzierung in 5proz. Essigsäure beibehalten. Die metachromatische Substanz von Preisz dürfte ebenfalls mit unseren Mikrogranula zusammenfallen, da sie nach einer größeren Reihe von Methoden sich metachromatisch färben lassen.

Allgemeiner Bau der Bakterien.

Wenn wir von den Sporenanlagen absehen, die ja nur in den sporenbildenden Bakterien (Anthrax, Tetanus usw.) und Spaltpilzen (Hefe) vorkommen und demnach nicht als charakteristischer Bestandteil jeder Bakterienzelle aufgefaßt werden dürfen, so können wir auf Grund der bishergien Untersuchungsergebnisse an jedem Bakterium folgende Teile unterscheiden: 1) Das Ektoplasma, 2) Endoplasma. Letzteres enthält noch zwei isolierte Bestandteile und zwar 3) den Kern (Makronukleus) und 4) den Mikronukleus (Kernkörperchen).

Was den Bau des Ektoplasmas betrifft, so konnte an anderer Stelle (5) nachgewiesen werden, daß es bei den grampositiven Bakterien aus einem sauren gramfesten Lipoid (Phosphatid) und einer basischen Eiweißsubstanz besteht. Bei den gramnegativen Bakterien ist das Ektoplasma ähnlich gebaut, nur enthält es ein gramnegatives Lipoid (vgl. 4). Der Zelleib enthält drei Substanzen, zwei saure und einen basischen Körper, nämlich die sauren Nukleoproteide, die an den unvorbehandelten Bakterien kräftig sich mit allen basischen Farbstoffen färben und durch Behandlung mit verdünnter Salzsäure bei gewöhnlicher Temperatur gelöst werden. Ferner ein gramnegatives Endolipoid, das an grampositiven Bakterien nachgewiesen worden ist (5), und endlich ein basisches Eiweiß als Grundsubstanz (5). Nach dem Abschnitt 1 dieser Arbeit besteht der Kern aus einem sauren Lipoid, ebenfalls ein Phosphatid, das an ein basisches Eiweiß gebunden ist. Einen ähnlichen Bau zeigt der Mikronukleus (vgl. Abschn. IV) und setzt sich zusammen aus einem sauren eisenhaltigen Lipoid und einem basischen Eiweiß.

Bau der Bakterienzelle (schematisch).



1) Ekto (α) -Lipoid
2) bas. Grundsubstanz } des Ektoplasmas
3) Nukleoproteide
4) Endo (β) -Lipoid
5) bas. Grundsubstanz } des Endoplasmas
6) γ-Lipoid
7) bas. Grundsubstanz } des Makronukleus
8) δ-Lipoid
9) bas. Grundsubstanz } des Mikronukleus

Textfig. 2.

Demnach konnten bisher in jeder Bakterienzelle neue verschiedene Substanzen unterschieden und färberisch nachgewiesen werden. Diese Körper lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen, nämlich: A. Basische Substanzen (Grundsubstanz, basisches Eiweiß): a) im Ektoplasma, b) im Endoplasma, c) im Kern, d) im Mikronukleus. B. Saure Substanzen: 1) Nukleoproteide: nur im Endoplasma enthalten. 2) Saure, gebundene Lipoide: a) im Ektoplasma (bei den grampositiven gramfest), b) im Endoplasma (gramnegativ), c) im Makronukleus und d) im Mikronukleus (gramfest).

Zur Unterscheidung der einzelnen Lipoide der Bakterienzelle dürfte es sich empfehlen, folgende Bezeichnungen einzuführen: α-(Ekto)Lipoid im Ektoplasma, β-(Endo)Lipoid im Zelleib, γ-Lipoid im Kern und δ-Lipoid im Mikronukleus.

In der nachstehenden Tabelle IV sind die neun verschiedenen Substanzen nach ihrer Verteilung auf die einzelnen Teile des Bakteriums: Endo-, Ektoplasma usw., angeordnet.

Tabelle IV.
Bestandteile der Bakterienzelle.

	Sauere Körper		Basisches Eiweiß (Grundsubstanz)
	Nukleoproteide	Lipoide	
Ektoplasma	—	α-(Ekto)Lipdid	+
Endoplasma	+	β-(Endo)Lipoid	+
Makronucleus	—	γ-Lipoid	+
Mikronucleus	—	δ-Lipoid	+

Unsere Kenntnisse über den Bau des Bakteriums lassen sich in das vorstehende Schema (S. 382) bringen.

V. Bau der Sporen.

Bei den eingehenden Untersuchungen über den mikrochemischen Bau der Hefe und Bakterien bot sich oft Gelegenheit, auch den Bau der in den Objektträgerausstrichen enthaltenen Sporen färberisch und mikrochemisch zu studieren. Bekanntlich zeichnen sich letztere von den Mutterbakterien dadurch aus, daß sie Farbstoffe im allgemeinen nur sehr schwer aufnehmen. Nur bei Färbung mit basischen Farbstoffen unter Karbolzusatz, oder sauren Farbstoffen bei Säurezusatz, bei gleichzeitigem Aufkochen der Farblösung gelingt es, die Sporen zu färben. Worauf die schwere Färbbarkeit dieser Gebilde beruht, ist bislang nicht mit Sicherheit bekannt. Man nimmt wohl allgemein an, daß die Sporen eine doppelte Membran besitzen, die das Eindringen des Farbstoffes erschweren soll. Nun haben wir nachweisen können, daß die Sporenmembran einen ähnlichen Bau wie das dazugehörige Bakterienektoplasma aufweist, nämlich, aus einer Lipoideiweißverbindung (gramfestes Lipoid und basischer Grundsubstanz) besteht (5). Selbst wenn man annimmt, daß die Sporen eine Doppelmembran besitzen — was übrigens bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte — so ist auch damit noch nicht ihre schwere Färbbarkeit ausreichend erklärt. Denn die Hefezelle, die, wie einwandfrei gezeigt werden konnte (5), ein zweischichtiges Ektoplasma besitzt, färbt sich sehr leicht, auch bei gewöhnlicher Temperatur mit den wässerigen Lösungen basischer Farbstoffe. Demnach müssen diese Farbkörper die äußere Hülle der toten Hefezellen mit Leichtigkeit durchdringen können. Diese Ueberlegungen führten daher rein theoretisch zu der Vorstellung, daß die Sporen außer der bereits oben erwähnten Membran noch eine andere Hülle von abweichender chemischer Zusammensetzung enthalten müssen. Nun konnten wir im Abschnitt III zeigen, daß die Vorsporen (Sporenanlagen) ein neutrales Lipoid, nämlich Cholesterinester enthalten. Dieser m. W. zuerst erhobene Befund legte daher den Gedanken nahe, daß ein solches Lipoid auch in den reifen Sporen enthalten sein dürfte. Die Untersuchungen, die nach dieser Richtung unternommen wurden, haben diese Vermutung bestätigen können.

Am leichtesten ließ sich der Bau der Hefesporen ermitteln. Bei diesen Zellen lassen sich die Sporen nach Behandlung mit 10proz. Salzsäure (Stad. I) schon bei gewöhnlicher Temperatur mit basischen, karbolhaltigen Farbstoffen leicht färben. Färbt man einen Hefeausstrich Stad. I z. B. mit Karbolmethylenblau 2—3 Min., so

zeigen die reifen Sporen eine breite dunkelblaue Membran; das hellblau erscheinende Zentrum läßt ein großes dunkelblaues Makrogranulum, zuweilen auch ein kleineres Mikrogranulum erkennen. Meist sieht man eine helle ungefärbte Lücke im Sporenleib (vgl. Textfig. 1). Auch die Umgebung der Sporen und die zwischen ihnen befindliche Substanz der Kapsel erscheint hierbei ungefärbt. Sehr leicht lassen sich die Sporen, auch wenn sie nur in geringer Zahl im Ausstrich enthalten sind, auffinden, wenn man einen solchen Objektträgerausstrich nach Karbolmethylenblaufärbung 1 Min. mit Phosphin nachbehandelt, dann sind die Hefezellen gelb, ihr Kern grün gefärbt, während die Sporen nebst Granula in blauer Farbe erscheinen (Fig. 3). Dieser Färbeversuch lehrt, daß die wässerige Phosphinlösung in die Sporen nicht einzudringen vermag und daher keine Um- bzw. Grünfärbung wie bei den Hefezellen herbeiführen kann.

Färbt man einen Hefeausstrich Stad. I mit Karbolmethylenblau und läßt nach dem Abspülen Anilinphosphin (1proz. wässerige Phosphinlösung, 10proz. Anilinöl āā., einige Tropfen Alkohol bis zur Klärung der etwas getrübten Lösung), einige Minuten (2—3 Min.) einwirken, so erscheinen die Sporen (Membran und Granula) grün (Fig. 26), während die Hefezellen gelb gefärbt sind, ebenso der etwas dunkler hervortretende Kern. Da die sauren Nukleoproteide durch die Vorbehandlung entfernt, also auszuschließen sind, so beweist die Grünfärbung dieses Versuches — nach den Ausführungen des Abschn. I — daß die Membran und das Makrogranulum der Sporen ein Phosphatid enthalten.

Dasselbe Resultat erhält man auch, wenn man die Karbolmethylenblau- (heiß gefärbt) Anilinphosphin-Methode auf unvorbehandelte Hefeausstriche anwendet. Auf Grund dieser Grünfärbung der Sporen hat Schumacher das Vorhandensein der freien Nukleinsäure behauptet (7). Diese Behauptung ist jedoch leicht durch den obigen Versuch zu widerlegen, da dieselben Färberesultate auch nach Salzsäurevorbehandlung erhalten werden, während Nukleinsäure schon durch 2proz. Salzsäure gelöst wird.

Das Makrogranulum der Sporen ist wohl als Kern aufzufassen, da es sich färberisch ebenso wie der Makronukleus der Hefezelle verhält.

Die oben erwähnten Färbungen mit basischen Karbolfarbstoffen lassen eine helle Lücke in den Sporen, die ebenso wie die Umgebung derselben ungefärbt erscheinen. Woraus diese basische Farbstoffe auch bei heißer Färbung nicht aufnehmende Massen bestehen, lehrt eine Färbung mit Sudan (Fig. 10). Nach dieser Methode zeigen die Sporen eine rote Membran und im Innern eine oder zwei rote Granula. Bemerkenswert ist, daß die Sporen in diesem Versuch größer erscheinen als bei den früheren Färbungen, so daß der Eindruck entsteht, daß die sudanrote Membran nicht mit der zuerst beschriebenen, basische Farbstoffe aufnehmenden, identisch ist. Immerhin konnte diese Annahme nicht als erwiesen betrachtet werden, da die zuerst erwähnte Sporenmembran ebenfalls sich, wie im Abschnitt II (Lezithinausstriche) gezeigt wurde, mit Fettfarbstoffen färben könnten. Sicheren Aufschluß über diese Frage gibt jedoch die Sudan-Karbolmethylenblau-Methode, die den gesamten Bau der Sporen zur Darstellung bringt: den blauen Kern und die blaue Innenmembran, eine rote äußere Membran und ein rotes Granulum im Sporenleib. Auch die zwischen den Sporen befindlichen Massen sind rot gefärbt (Fig. 14). Nach der im Abschnitt II erörterten Theorie der Lipoidfärbungen gibt diese Methode gleichzeitig

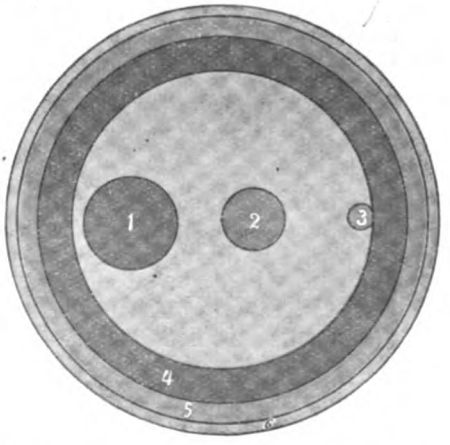
Aufschluß über den chemischen Bau der Sporen. Sie enthalten hiernach im Kern ein saures gebundenes Lipoid und eine ebenso gebaute Innenmembran und außerdem ein neutrales Lipoid als Zwischenschicht, sowie einen Innenkörper von gleicher chemischer Beschaffenheit. Gleichzeitig ist die gemeinsame Kapsel mehrerer Sporen schwach bläulich gefärbt, muß also ebenfalls ein saures Lipoid enthalten (äußere Membran der Sporen).

Endlich enthält jede Spore noch ein Mikrogranulum, das nahe dem Rande gelegen ist [vgl. Fig. 3 und 25 in Ektoplasma der Bakterien 3—4 (5)]. Das Mikrogranulum läßt sich auch nach Gram färben.

Färbt man einen normalen Hefeausstrich nach Gram und behandelt nach der Alkoholdifferenzierung mit konzentriertem Tannin und dann mit Safranin nach, so zeigen die Sporen eine dunkelblaue Membran und ein ebenso gefärbtes Mikrogranulum. Eine schmale Zone um die Sporen ist ungefärbt, die wohl dem neutralen Lipoid entsprechen dürfte, und die nach außen hin von einer schmalen roten Membran begrenzt wird (äußere Membran), die in die ebenfalls rot gefärbte Kapsel übergeht. Die Hefezellen zeigen hierbei ein fast schwarzes Ektoplasma, das nach außen in eine rötliche Schicht übergeht. Der Zelleib ist schwächer gefärbt. Diese Methode bestätigt also wiederum die bereits früher festgestellte Tatsache, daß das Ektoplasma der Hefezellen gramfest ist (Fig. 27).

Demnach bestehen die reifen Sporen aus folgenden Teilen: 1) Kern (Proteophosphatid), 2) Innenmembran (gleicher chemischer Bau), 3) Innenkörper (neutrales Lipoid), 4) Zwischenschicht (neutrales Lipoid), 5) Außenmembran (Lipoideiweißverbindung) und endlich 6) Mikrogranulum, das ebenfalls Eisen enthält, wie ich speziell bei den Milzbrandsporen noch beweisen will. Der Bau der Sporen läßt sich demnach schematisch folgendermaßen darstellen.

Bau der Hefesporen (schematisch).



1) Makronukleus, 4) Innere Membran,
2) Innenkörper, 5) Zwischenschicht,
3) Mikronukleus, 6) Aeußere Membran.

Textfig. 3.

Zu bemerken wäre noch, daß Außen- und Innenmembran, Kern und Mikrogranulum, je zwei Substanzen, saures Lipoid und basische Grundsubstanz enthalten, so daß demnach in der Hefespore bis jetzt zehn verschiedene Körper nachgewiesen worden sind. Ob daneben noch Nukleoproteide ebenso wie in den Hefezellen auch in den Sporen enthalten sind, vermag ich vorläufig nicht zu entscheiden.

Bei den im Vergleich zur Hefe viel kleineren Sporen des Milzbranderregers war die mikrochemische Analyse mit ziemlich großen Schwierigkeiten verknüpft. Zunächst unterscheiden sie sich von den Hefesporen in färberischer Beziehung dadurch, daß sie auch nach Salzsäurevorbehandlung (Stad. I) sich nur heiß färben lassen, und zweitens gibt es hier die oben erwähnten Innensporen, die sich noch in den Mutterbakterien befinden. Bei Färbung der Objektträgerausstriche mit Karbolfarbstoffen (Karbolfuchsin, Karbolmethylenblau) bei ge-

wöhnlicher Temperatur erscheint nur die Membran der freien und Innensporen gefärbt. Kocht man dagegen die Farbstofflösung auf, so erscheinen die Sporen als ovale Körper in toto gefärbt, lassen jedoch oft daneben noch die Membran als dunkler gefärbten Ring erkennen.

Diese ovalen Körper stellen jedoch nicht die gesamte Spore dar. Am leichtesten gelingt es, diesen Nachweis bei ganz jungen Sporen zu führen. Färbt man eine 24std. Anthraxkultur, die reichlich Sporen bildet, nach der Karbolmethylenblau-Tannin-Safranin-Methode, wobei die erste Lösung gekocht wird, so erscheinen (Fig. 28) die Sporen als dunkelblaue Körper und lassen eine ungefärbte Zwischenschicht erkennen, die nach außen von einer roten Membran begrenzt wird. Durch Karbolmethylenblau-Anilin-Phosphin erscheinen sie ebenso wie bei der Hefe grün mit ungefärbter Zwischenschicht und gelber Außenmembran. Die Grünfärbung beweist ein saures Phosphatid, da sie ebenso wie bei der Hefe auch im Abbaustadium I erhalten wird (Fig. 29).

Die übliche Darstellung der Sporen beruht auf der Färbung der inneren Membran. Sie enthalten im Innern ein Granulum, den Kern, den man nach folgender Methode gut sichtbar machen kann (auch an alten Sporen).

Ein Milzbrandausstrich Stad. I wird mit Polychrom-Methylenblau 2—3 Min. heiß gefärbt und dann mit konzentriertem Tannin 10 Min. nachbehandelt, abgespült und getrocknet: Die freien und Innensporen zeigen eine rötlich violette Membran und im Innern ein dunkelviolettes Granulum, während der Rest des Sporenkörpers ungefärbt ist. Die Sporenanlagen treten als helle runde Lücken mit blauer Membran hervor, außerdem sind in den Stäbchen zahlreiche Granula sichtbar, die zum Teil den Kern, zum Teil der Mikrogranula der Bakterien gehören (Fig. 31).

Aehnlich wie bei Hefesporen dürfte der ungefärbte Teil in den Anthraxsporen ebenfalls sich aus einem neutralen Lipoid zusammensetzen, obgleich dieser Nachweis mit Fettfarbstoffen bisher nicht gelungen ist. Aehnlich zusammengesetzt ist die Zwischenschicht der eben erwähnten jungen Sporen, wie sich die Färbung mit Sudan nach folgender Methode zeigen läßt. Färbt man einen Milzbrandausstrich Stadium I in einer Kuvette mit alkoholischer Sudanlösung auf dem Wasserbade etwa 15—30 Min., so zeigen die Sporen eine rote Membran, während das Zentrum ungefärbt ist. Da hierbei die Sporen viel größer erscheinen, so muß diese Membran der Zwischenschicht, die basische Farbstoffe nicht aufnimmt, angehören (Fig. 32).

Demnach besitzen die ganz jungen Sporen eine als Kapsel zu bezeichnende Zwischen- und Außenschicht, die die eigentlich bisher nur färberisch sichtbar gemachten Sporen umgibt. Diese Kapsel mußte auch an älteren Sporen erwartet werden, doch war der Nachweis äußerst schwierig. Zwar zeigen die älteren Sporen bei Mikroskopierung mit starker Abblendung einen hellen ungefärbten Ring. Doch gelang es nicht, diesen durch eine Färbung sichtbar zu machen. Nach langen Versuchen konnte auch bei den älteren Sporen der Nachweis der Kapsel, und zwar mit Hilfe folgender Methode erbracht werden:

Anthraxausstriche werden 5 Min. mit 5proz. Essigsäure behandelt, abgespült, 5—10 Min. mit konzentr. Tannin gebeizt, und nach dem Abspülen mit Ziehlscher Lösung 30 Min. (!) nachgefärbt. Dann zeigen die Sporen einen ungefärbten Körper mit dunkelroter Innenmembran, die nach außen in eine breite, schwach rötliche Schicht übergeht. Daß hierbei auch die Zwischenschicht, die als neutrales Lipoid sich mit Fuchsin ja nicht färbt, rötlich erscheint, dürfte auf

der starken Ueberfärbung (30 Min.!) beruhen. An einzelnen Sporen erkennt man tatsächlich nur die Außenmembran als schmale rötliche Linie mit heller Zwischenschicht (Fig. 30).

Schließlich besitzen die Anthraxsporen auch ein Mikrogranulum, das sich mit basischen Farbstoffen (Fig. 5), nach Eisenberg (Fig. 16b) färbt und ebenfalls Eisen enthält (vgl. Fig. 25).

Demnach kann man wohl behaupten, daß die Anthraxsporen den gleichen Bau wie die der Hefezellen aufweisen.

Ergebnisse.

1) An der Hefezelle und an allen Bakterien läßt sich im Zelleib ein Makrogranulum nachweisen, das die gleichen färberischen und Löslichkeitseigenschaften wie der Amöbenkern zeigt. Es wird daher als Kern der Bakterien aufgefaßt und als Makronukleus bezeichnet. — 2) Der Makronukleus zeigt dieselben färberischen Eigenschaften wie Objektträgerausstriche von chemisch reinem Lezithin und besteht aus einer Phosphatideiweißverbindung (Proteophosphatid), wahrscheinlich ist sein saurer Bestandteil ein Lezithinlipoid (Lezithoproteid). — 3) An allen Bakterien und an der Hefezelle läßt sich außerdem ein Mikrogranulum nachweisen, das gramfest und eisenhaltig ist und ebenfalls aus einer Lipoideiweißverbindung besteht. Es wird als Mikronukleus bezeichnet. — 4) In den Hefezellen und Anthraxbakterien sind runde Körper nachweisbar, die die Sporenanlagen (Vorsporen) darstellen. Sie bestehen aus einem neutralen Lipoid (Cholesterinester), einer äußeren Membran (Lipoideiweißverbindung) und einem Mikrogranulum. — 5) Es werden zwei Methoden, Sudan-Karbolmethylenblau- und Nilblaubase-Methoden angegeben, die neutrale und saure Lipoide färberisch voneinander zu unterscheiden gestatten. — 6) Die Sporen setzen sich zusammen aus einer Innen- und Außenmembran (Proteophosphatid) und einer Zwischenschicht, die ein neutrales Lipoid enthält. Die Sporen besitzen einen Kern (gebundenes saures Lipoid bzw. Phosphatid) und außerdem einen Innenkörper, der ebenfalls aus einem neutralen Lipoid besteht. Außerdem enthalten sie am Rande der Innenmembran ein Mikrogranulum, das ebenfalls eisenhaltig ist und denselben Bau wie der Mikronukleus der Bakterien aufweist. — 7) Die Hefe- und Bakterienzellen bestehen aus vier einzelnen Teilen: Ektoplasma, Endoplasma, Makronukleus und Mikronukleus, von denen jedes ein basisches Eiweiß als Grundsubstanz enthält. Außerdem enthalten die Bakterien fünf saure Körper: die sauren Nukleoproteide — nur im Zelleib enthalten — und vier gebundene saure Lipoide, nämlich im Ektoplasma [Ekto (α)-Lipoid], im Zelleib [Endo (β)-Lipoid], im Makronukleus (γ-Lipoid) und Mikronukleus (δ-Lipoid).

Erläuterung der Tafelabbildungen.

Die Figuren 11—12 sind mit Objektiv 3, Okular 4 (Zeiß), die übrigen mit $^1/_{12}$ Oelimmersion und gleichem Okular gezeichnet.

Abkürzungen[1]): M = Methylenblau, pM. = polychromes Methylenblau (Unna), F = Fuchsin, S = Safranin, T = Tannin 5proz., T′ = Tannin 30proz., Ph. = Phosphin, Gg = Guineagrün, W = Wasserblau, cM = Karbolmethylenblau, cAz = Karbolazur, aPh = Anilinphosphin, Ess = Essigsäure 5proz.

Fig. 1. Hefeausstrich I (1. Abbaustad.): cM (3—5′). T (1—2′). S ($^1/_2$′). Makrogranulum blau, Ektoplasma rot, ebenso Mikrogranula. Die Vorsporen erscheinen als helle Ringe, zum Teil mit rötlicher Membran.

Fig. 2. Hefeausstrich I pM (5′): Makrogranula violett, Leib hellviolett, Sporenanlagen erscheinen als helle Kreise mit rötlichen Mikrogranula. Ektoplasma rötlich violett. Sporen haben rötlich-violette Membran, einen blauen Kern und meistens eine helle Lücke.

Fig. 3. Hefeausstrich I cM (3′), Ph (1—$1^1/_2$′): Hefekern grün, Leib gelb. Die Sporen zeigen eine dicke blaue Membran, blaues Makrogranulum (Kern), kleines Mikrogranulum, außerdem eine helle ungefärbte Lücke.

Fig. 4. Hefeausstrich I, Böhmers Hämatoxylin (15′): Makrogranulum dunkelviolett, Leib hellviolett.

Fig. 5. Milzbrand (Abbaustad. I) cM (3—5′), T (1—2′), S ($^1/_4$—$^1/_2$′): Makrogranula blau, Ektoplasma und Mikrogranula rot. Die Sporen haben eine rote Membran, blaues Mikrogranulum und ungefärbtes Zentrum.

Fig. 6. Proteus vulgaris (Stad. I) cM (5′), T (1—2′), S (2′): 1—2 blaue Makrogranula, Ektoplasma rot, Leib ungefärbt.

Fig. 7. Gonokokkus (Stad. I) ebenso gefärbt: Kern blau, Ektoplasma rot, Zelleib ungefärbt.

Fig. 8. cM (3′), T (2′), Ph (1′): a) Milzbrand (Stad. I): Makrogranula grün, Mikrogranula rot, Ektoplasma gelb; b) Staphylococcus (Stad. I) c) Diphtherie I: Makrogranula grün, Ektoplasma gelb.

Fig. 9 a. Diphtherieausstrich unvorbehandelt. cAz (3′), T (2′), Ph (1—2′): Polkörner schwarz-braun, Stäbchen hellgelb.

Fig. 9 b. Desgleichen cAz (heiß 5′), Ess ($^1/_4$′), T (2′), Ph (1—2′): Leib gelb, Polkörner rot, Makrogranula grün.

Fig. 10. Hefeausstrich I (Sudanfärbung): In einzelnen Zellen sind nur die Makrogranula und Mikrogranula rot gefärbt. Andere Zellen enthalten außerdem größere rote Granula (Sporenanlagen). Die Sporen zeigen eine rote Membran (Zwischenschicht) und rote Granula. Das im Präparat helle Ektoplasma und die ebenfalls ungefärbte Sporenkapsel ist durch eine hellviolette Linie angedeutet (!).

Fig. 11. Heuamöben (Stad. I) F (2′), T (2′), M (1′): Kern rot, Ektoplasma blau

Fig. 12. do. W (3′), T (2′), S (1′): Kern blau, Leib rot.

Fig. 13. Hefeausstrich (Stad. II). (Vorbehandlung mit heißer 2proz. Salzsäure) pM (3′): Membran der Sporenanlagen violett, Mikrogranula rot.

Fig. 14. do. Sudan. cM (1′): Hefezellen zeigen blauen Kern und rote Sporenanlagen. Die Sporen sind blau mit deutlicher Membran, blauem Kern und rotem Innenkörper. Die zwischen den Sporen befindlichen Substanzen sind ebenfalls rot.

Fig. 15. do. Nilblaubase-Methode: Sporenanlagen rot mit blauer Membran, Zelleib hellblau. Die Sporen sind blau gefärbt mit deutlicher Membran, die von außen von einer roten Schicht umgeben ist. Der Sporenkörper zeigt rote Granula (Innenkörper). Die zwischen den Sporen befindlichen Substanzen sind ebenfalls rot.

Fig. 16. a) Hefeausstrich I, b) Anthrax I. Eisenbergsche Färbung T (2′), S ($^1/_2$′): Ektoplasma rot, Sporenanlagen zeigen eine dicke schwarze Membran, Mikrogranula ebenso gefärbt.

Fig. 17. Anthrax I. Nilblaubase-Methode: Sporenanlagen rot mit dunklerem Mikrogranulum, Leib blau. Die reifen Sporen zeigen blaue Membran und helles Zentrum.

Fig. 18. Anthrax Stad II. Gram. T (2′), S (1′): Mikrogranulum dunkel, Ektoplasma rot.

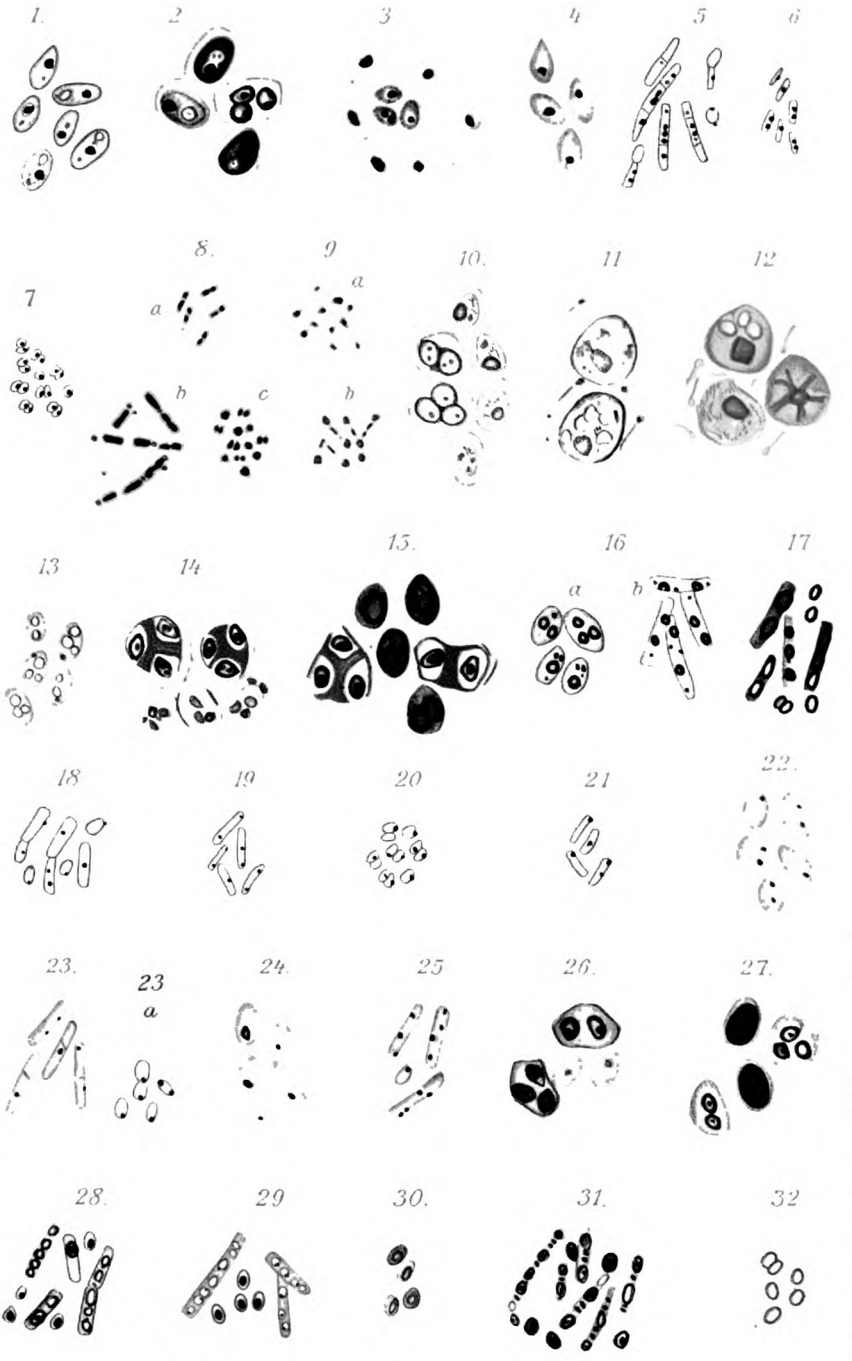
Fig. 19. Diphtherieausstrich unvorbehandelt. Eisenbergsche Färbung T (2′), S ($^1/_4$′): Mikrogranula blauschwarz, Ektoplasma rot.

Fig. 20. Gonococcus und

Fig. 21. Proteus vulgaris: Gram T′ (2′), S (1′): Ektoplasma rot, Mikrogranula blauschwarz.

---

1) Alle Farbstoffe wurden, soweit nicht eine andere Zusammensetzung angegeben ist, als 1proz. wässerige Lösungen verwandt.


1.
2
3
4
5
6
7
8.
a
b
c
9
a
b
10.
11
12
13
14
15.
16
a
b
17
18
19
20
21
22.
23.
23
a
24.
25
26.
27.
28.
29
30.
31.
32

LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS

Fig. 22. Hefeausstrich (Abbaustad. III) Sudanfärbung: Mikrogranula rot gefärbt.
Fig. 23. Anthrax I. Gg (2′): Mikrogranula dunkelgrün, Leib hellgrün.
Fig. 23a. do. Gg (2′), T (2′), S (1/2′): Sporenmembran rot, Mikrogranula grün.
Fig. 24. Hefeausstrich: BerlinerBlaureaktion-Kongorot (1:1000) (2—5″): Mikrogranula blau gefärbt, zum Teil auch größere blaue Granula (Kern?, Membran der Sporenanlagen?).
Fig. 25. Anthrax: Berliner-Blaureaktion: Mikrogranula der Stäbchen und der Sporen blau.
Fig. 26. Hefeausstrich I: cM (3′), aPh (2—3′): Sporenmembran und Kern grün. Rest der Sporenkörper ungefärbt. Die Hefezellen sind gelb und haben einen dunkleren Kern.
Fig. 27. Hefeausstrich unvorbehandelt. Gram T′ (2—5′), S (2′): Sporenmembran und Mikrogranula blauschwarz. Helle Zwischenschicht. Aeußere Membran und Kapsel rot. Die Hefezellen zeigen eine schwarze Innenmembran und eine rötliche Außenschicht.
Fig. 28. Anthrax unvorbehandelt. cM (heiß 3′), T (2′), S (1/4′) 24std. Kultur: Sporen blau mit heller Zwischenschicht und äußerer roter Membran. Sporenanlagen ungefärbt mit bläulicher Membran, rotem Mikrogranulum.
Fig. 29. Anthrax I. cM (heiß 3′), aP (2—3′): 24std. Kultur. Sporen grün, helle Zwischenschicht, äußere Membran gelb, die Sporenanlagen sind hell mit gelber Membran und roten Mikrogranula.
Fig. 30. Anthrax I. Alte Kultur. Ess (5′), T (5′), Ziehlsche Lösung (30′!): Die Sporen zeigen eine dunkelrote Innenmembran, helles Zentrum und eine rötliche Kapsel. Einzelne Sporen zeigen statt der Kapsel eine helle Zwischenschicht und eine sehr dünne rötliche Außenmembran.
Fig. 31. Anthrax I. pM (heiß 3′), T′ (10—15′): Sporenmembran rötlich violetter Kern, Rest der Sporenkörper ungefärbt. Innensporen zeigen gleiche Färbung, die Bakterien zeigen helle Sporenanlagen und blaue Granula verschiedener Größe. (Makro- und Mikrogranula).
Fig. 32. Sudanfärbung (heiß): Sporen haben eine sudanrote Membran (Zwischenschicht).

Literatur.

1) Zit. nach Gotschlich, l. c. — 2) Zitiert nach Lehmann, Atlas und Grundriß d. Bakteriologie. S. 10—11. — 3) Schumacher (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88. — 4) Gutstein, Ueber das Ektoplasma und den Kern der Bakterien. (Ibid. Abt. I. Refer. Bd. 78. S. 563.) — 5) Ders., Ibid. Abt. I, Orig, Bd. 95. — 6) Ders., Ibid. Bd. 93. — 7) Schumacher, Ibid. Bd. 23. S. 381. — 8) Unna, Ibid. Bd. 80. — 9) Zitiert nach Hdb. der biolog. Arbeitsmethoden von Abderhalden, Abt. I. T. 6. S. 103. — 10) Kraus-Uhlenhuth, Hdb. d. mikrobiol. Arbeitsmeth. Bd. I. S. 299. — 11) Gutstein, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 94. — 12) Lehmann, l. c. S. 19. — 13) Macallum, Die Methoden u. Ergebn. d. Mikrochemie in der biologischen Forschung. (Ergebn. d. Physiol. Bd. 7. S. 591.) — 14) Preisz, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35.

Nachdruck verboten.

Ueber die B. Paratyphus B-Bazillengruppe bei einer Nahrungsmittelvergiftung.

[Aus dem bakteriologischen Institut der Universität zu Sendai (Direktor: Prof. Dr. K. Aoki).]

Von Dr. **Kikuo Sakai.**

Unter den Mikroorganismen, welche bei Fleischvergiftung gefunden werden, ist außer den Enteritisbazillen die Gruppe der Paratyphus B-Bazillen am häufigsten nachweisbar. Diese Mikroben sind unterein-

ander so nahe verwandt, daß man sie nicht nur mikroskopisch und kulturell, sondern auch pathologisch kaum unterscheiden kann. Ebenso sind sie agglutinatorisch gegenseitig so stark beeinflußbar, daß man dadurch irgendeine Differenzierung nicht leicht ausfindig machen kann. Daher glaubt man gewöhnlich nach Angabe von Schottmüller, daß sie bei Menschen entweder typhöse Erkrankung oder akute Gastroenteritis hervorrufen können. Aber Bainbridge behauptet, daß Mikroben, welche bei typhöser Erkrankung nachgewiesen worden sind, von den andern, welche bei Gastroenteritis nachweisbar waren, ganz verschieden sind. Zu derselben Meinung gelangte Aoki durch seine agglutinatorische Untersuchung derselben Bakterien. Dabei konnte er sie in 2 große Gruppen einteilen. Die 1. Gruppe umfaßt diejenigen Stämme, welche nur bei typhöser Erkrankung des Menschen gefunden worden sind. Die 2. Gruppe enthält dagegen diejenigen Stämme, welche sowohl bei Fleischvergiftung des Menschen als auch bei Erkrankungen im Tierreich gefunden worden sind, wie B. Aertryck, psittacosis, typhi murium u. a. Die Stämme der 2. Gruppe werden ferner durch die Sera der 1. Gruppe in 2 Untergruppen geteilt: Die 1. Untergruppe der 2. Gruppe wird in Seren der 1. Gruppe, nämlich Paratyphus B-Bazillen Schottmüller, so stark agglutiniert, daß man sie dadurch von letzteren kaum unterscheiden kann. Dagegen können die Stämme der 2. Untergruppe in denselben Seren nur ganz schwach beeinflußt werden. Auf gleiche Weise können die Stämme von B. Paratyphus B Schottmüller in den Seren der 2. Untergruppe der 2. Gruppe nicht agglutiniert werden. Aoki nannte die 1. Gruppe B. Paratyphus B Schottmüller, die 2. Gruppe Mäusetyphusbazillen, von denen die 1. Untergruppe bequemlichkeitshalber als Mäusetyphusbazillen im engeren Sinne und die 2. Untergruppe als Aertryckform der Mäusetyphusbazillen bezeichnet wurde.

Daraufhin untersuchte ich viele Stämme der Paratyphusbazillengruppe in den von Aoki angegebenen repräsentierenden Sera agglutinatorisch, welche teils bei typhöser Erkrankung von Menschen, teils bei Fleischvergiftungen von Menschen und bei Tiererkrankungen gezüchtet worden waren. Es wurde dabei festgestellt, daß das von Aoki bei Paratyphus B-Bazillen und Mäusetyphusbazillen angegebene agglutinatorische Verhalten bei diesen Stämmen ganz regelmäßig nachweisbar ist. In dieser Zeit hatten Konno und Verfasser in unserem Institute Gelegenheit, einen Fall schwerer Nahrungsmittelvergiftung, welche bei vielen Arbeiterinnen in einer Fabrik in Kōriyama erfolgt war, bakteriologisch genau zu untersuchen. Dabei wurden bei allen Kranken Bakterien aus der Paratyphusgruppe nachgewiesen. Nach unseren genaueren agglutinatorischen Untersuchungen in den repräsentierenden Sera wurde festgestellt, daß sie nicht zu B. Paratyphus B Schottmüller, sondern zu einer Abart der Mäusetyphusbazillen, nämlich zu der Aertryckform, gehörten. Ferner berichtete im darauffolgenden Jahre Kajitsuka über einen Fall von Nahrungsmittelvergiftung bei der japanischen Feldarmee in Spaskaya. Dabei fand er bei mehreren Kranken Stämme der Paratyphusgruppe, welche von Paratyphus B-Bazillen kaum unterscheidbar sind.

Aus oben erwähntem Grunde hielt ich es für sehr nötig, diese Stämme mit unseren typischen repräsentierenden Stämmen vergleichend zu untersuchen. Freundlicherweise wurden im ganzen 7 Stämme unserem In-

stitut geschickt, wofür wir auch hier unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Dieser Stämme waren es im ganzen 7, nämlich Ms 59—Ms 65. Sie wurden zuerst mikroskopisch und kulturell genau geprüft. Dabei ergab sich, daß sie sich ganz ähnlich wie die Paratyphusbakterien verhielten. Dann wurden sie in den 6 repräsentierenden Sera agglutinatorisch geprüft. Diese Sera bestehen aus Paratyphus B-, Mäusetyphus- und Gärtner-Serum. Als Serum der Mäusetyphusbazillen wurden 2 Sera, Ms 2 und Ms 34, benützt, von denen das erstere dasjenige darstellt, welches B. Paratyphus B Schottmüller so stark wie eigene Bazillen agglutinieren kann; das letztere dasjenige, welches als Stämme Mäusetyphusbazillen bis zum Titer, aber alle Stämme Paratyphus B-Bazillen ganz schwach beeinflußt. Als Serum der Paratyphus B-Bazillen wurden ebenfalls 2 Sera gebraucht, nämlich PB 14 und PB 37, von denen das 1. dasjenige darstellt, welches alle Stämme der Paratyphus B-Bazillen bis zum Titer, die Mäusetyphusbazillen im engeren Sinne ganz oder fast bis zum Titer, aber die Stämme der Aertryckform gar nicht agglutinieren kann; das letztere dasjenige, welches alle Stämme der Paratyphus B-Bazillen bis zum Titer, aber alle Mäusetyphusbazillen ohne Ausnahme nur schwach agglutinieren kann. Es ergab sich, daß die 7 Stämme von den 2 Sera Mäusetyphusbazillen ausnahmslos bis zum Titer agglutiniert wurden, dessen Titer 1:10000 stark war. Sie wurden aber im Paratyphus B-Serum, PB 14, dessen Titer 1:5000 stark war, nicht so deutlich beeinflußt. 4 unter den 7 Stämmen wurden zwar fast bis zum Titer, doch ganz undeutlich, die übrigen 3 Stämme darin nur ganz schwach, nämlich bis 1:500, beeinflußt. Dagegen wurden sie alle im Serum der PB 37 gar nicht agglutiniert. Ebenso verhielten sie sich in den Seren von Gärtner-Bazillen E.G. 3, E. G. 15 (Tabelle 1).

Tabelle 1.

Name der Immunsera	K. 430 P.B. 14	K. 505 P.B. 37	K. 432 Ms. 2	K. 449 Ms. 34	K. 957 E.G. 3	K. 973 E.G. 15
Name der Bakterien / Titer	5000	5000	10000	10000	20000	5000
Ms. 59	5000 ±	100 —	10000	10000	100 —	100 —
„ 60	500 ±	100 —	10000	10000	100 —	100 —
„ 61	5000 ±	100 —	10000	10000	100 —	100 —
„ 62	500 ±	100 —	10000	10000	100 —	100 —
„ 63	5000 ±	100 —	10000	10000	100 —	100 —
„ 64	500 ±	100 —	10000	10000	100 —	100 —
„ 65	2000	100 —	10000	10000	100 —	100 —

Nach den obigen Resultaten muß angenommen werden, daß diese Stämme nicht zu den B. Paratyphus B-, wohl aber zu den Mäusetyphusbazillen gehören.

Die Mikroben der Aertryckform, welche schon von Konno und Sakai untersucht worden waren, zeigten anfangs ihr typisch agglutinatorisches Verhalten; sie agglutinierten nämlich im Paratyphus B-Serum ganz schwach. Aber dieser Zustand änderte sich durch mehrmalige Umzüchtungen so, daß sie endlich im Paratyphus B-Serum sehr stark agglutinierten. Infolgedessen wurde diese Kultur in Kolonien zerlegt, um festzustellen, ob solche Kolonien in der Kultur noch vorhanden sind,

welche im Paratyphus B-Serum schwer agglutinierbar sind. Dabei wurden zweierlei Kolonien nachgewiesen, von denen die eine im Paratyphus B-Serum sehr stark, fast bis zum Titer, und die andere, welche der originalen Aertryckform entspricht, sehr schwach agglutiniert. Wenn man diese einzelnen Kolonien mehrmals umzüchtete, so ging aus einer Art der Kolonie die andere Kolonieart hervor. Auf Grund dieser Erfahrung wurden unsere 7 Stämme gleichfalls in Kolonien zerlegt, um zu erforschen, ob diese Bakterien auch gleiches Verhalten zeigen würden. Es ergab sich dabei, daß jeder Stamm zweierlei Kolonien enthält, von denen die eine in den beiden Sera von Mäusetyphusbazillen, Ms 2 und Ms 34, bis zum Titer, in dem Serum PB 14 ebenfalls sehr stark, aber in dem Serum PB 37 ganz schwach agglutinieren kann, und die andere in den beiden Mäusetyphussera bis zum Titer, aber in beiden Paratyphus B-Sera ganz schwach beeinflußt wird. Nach diesem Befunde müssen erstere als Mäusetyphusbazillen im engeren Sinne, letztere aber als Mäusetyphusbazillen der Aertryckform angesprochen werden. Hier bezeichne ich bequemlichkeitshalber erstere Stämme als a-Form und letztere als b-Form (Tabelle II).

Tabelle II.

Name der Immunsera	K. 515 P.B. 9	K. 505 P.B. 37	K. 720 Ms. 2	K. 1280 Ms. 34	K. 957 E.G. 3	K. 973 E G. 15
Name der Bakterien / Titer	10 000	5000	10 000	5000	10 000	5000
Ms. 59a	10 000	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
„ b	100 ±	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
Ms. 60a	10 000	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
„ b	100 ±	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
Ms. 61a	10 000	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
„ b	100 ±	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
Ms. 62a	10 000	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
„ b	100 ±	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
Ms. 63a	10 000	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
„ b	100 ±	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
Ms. 64a	10 000	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
„ b	100 ±	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
Ms. 65a	10 000	100 —	10 000	5000	100 —	100 —
„ b	100 ±	100 —	10 000	5000	100 —	100 —

Ferner immunisierte ich Kaninchen mit den oben genannten reinen Stämmen unter folgenden Vorsichtsmaßregeln: Um eine Verunreinigung der einen Form durch die andere zu vermeiden, wurde die Kultur beider Formen durch Plattenverfahren in Kolonien zerlegt. Diese Kolonien wurden in dreierlei Immunsera, nämlich Ms 2, Ms 34 und PB 14, zur Probe agglutinatorisch geprüft. Die Kolonien, welche dabei nur in Serum Ms 2 und Ms 34 recht deutlich reagierten, wurden auf Schrägagar geimpft. Diese Kulturen wurden am folgenden Tage in 2 Mäusetyphusseren, nämlich Ms 2 und Ms 34, und 2 Paratyphusseren, nämlich PB 14 und PB 37, genau agglutinatorisch untersucht, um festzustellen, welche Kulturen sicher als a-Form und welche sicher als b-Form anzusehen sind. Die Aufschwemmung der Kulturen, welche dabei entweder als a-Form oder als b-Form typisch reagierten und noch übrig geblieben waren, wurde bei 60° C 15 Min. lang erhitzt und Kaninchen eingespritzt. Das gleiche Verfahren wurde bei jeder Vorbehandlung

immer neu ausgeführt. Erst auf diese Weise kann man Kaninchen sicher mit reiner a- und b-Form immunisieren. Durch diese exakte Methode wurden je 2 Kaninchen mit 2 Stämmen der b-Form, nämlich Ms 60b und Ms 65b, und noch mit 2 Stämmen der a-Form, nämlich Ms 59a und Ms 62a, vorbehandelt. Die Tiere wurden auf diese Weise im ganzen 4mal vorbehandelt. In den dabei hergestellten Seren wurden 2 Stämme der b-Form und noch 2 Stämme der a-Form gegenseitig agglutinatorisch geprüft. Dabei ergab sich, daß alle Serastämme der a- und b-Form gegenseitig gleich stark, bis zum Titer, agglutinieren können. Daraufhin wurden in den Seris, welche mit den Stämmen der b-Form hergestellt worden waren, andere heterologe repräsentierende Mäusetyphusstämme, nämlich Ms 2 und Ms 34, 2 Stämme Paratyphus B-Bazillen und 2 Stämme Gärtner-Bazillen agglutinatorisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Sera die heterologen Stämme der Mäusetyphusbazillen gleich stark wie die homologen Stämme, dagegen die Stämme Paratyphus B-Bazillen ebenso schwach wie Gärtner-Bazillen agglutinierten. In den Sera der a-Form wurden ferner dieselben Stämme agglutinatorisch untersucht. Diese Sera agglutinierten nicht nur die heterologen Stämme Mäusetyphusbazillen, sondern auch einen Stamm Paratyphus B gleich stark bis zum Titer. Aber noch ein anderer Paratyphusstamm, PB 37, wurde dabei sehr schwach agglutiniert. Hier muß bemerkt werden, daß dieser Stamm, PB 37, denjenigen darstellt, welcher in allen Paratyphus B-Sera ohne Ausnahme bis zum Titer beeinflußbar ist. Nach diesem Ergebnis muß auch angenommen werden, daß diese Stämme der a-Form sicher zu den Mäusetyphusbazillen im engeren Sinne, die der b-Form zur Aertryckform gehören müssen (Tabelle III).

Tabelle III.

Name der Immunsera	K. 1920 Ms. 60b	K. 1921 Ms. 65b	K. 1922 Ms. 59a	K. 1923 Ms. 62a
Name der Bakterien				
Ms. 60b	20 000	20 000 ±	100 000	50 000
„ 65b	20 000	20 000 ±	100 000	50 000
„ 59a	20 000	20 000 ±	100 000	50 000
„ 62a	20 000	20 000 ±	100 000	50 000
„ 2	20 000	20 000 ±	100 000	50 000
„ 34	20 000	20 000 ±	100 000	50 000
P.B. 1	500	500	50 000	20 000
P.B. 37	500 ±	200	2 000	1 000
E.G. 3	500 ±	100	500	500 ±
E.G. 15	500 ±	100	100 ±	500 ±

Ferner wurde beobachtet, in welchem Zahlenverhältnis diese beiden Formen in Originalkulturen enthalten sind. Jeder Stamm wurde durch Plattenverfahren in Kolonien zerlegt. 100 Stücke dieser Kolonie wurden in repräsentierenden Sera agglutinatorisch geprüft, um zu erkennen, wieviel Kolonien darunter zur a-Form, wieviel zur b-Form gehören. Es stellte sich dabei heraus, daß die a-Form bei dem Stamm Ms 59 im Verhältnis von 56 Proz.; bei Ms 60; bei Ms 61 28 Proz., bei Ms 62 45 Proz.; bei Ms 63 25 Proz.; bei Ms 64 76 Proz. und bei Ms 65 67 Proz. vorhanden war. Auf gleiche Weise wurde die b-Form bei dem Stamme Ms 59 im Verhältnis von 44 Proz.; bei Ms 60 60 Proz.; bei Ms 61

72 Proz.; bei Ms 62 55 Proz.; bei Ms 63 75 Proz.; bei Ms 64 24 Proz. und Ms 65 33 Proz. nachgewiesen.

Zum Schluß wurden diese Stämme absorptorisch untersucht. Zuerst wurde das Serum der a-Form von dem Stamm der b-Form absorbiert. Es ergab sich dabei, daß sowohl Hauptagglutinine als auch sämtliche Mitagglutinine total verschwunden waren. Ferner wurde dasselbe Serum mit den Mäusetyphusstämmen Ms 8 und Ms 34 gesättigt. Dabei trat dasselbe Resultat ein, wie oben. Dasselbe Verfahren wurde bei Paratyphus B-Bazillen ausgeführt. Es wurde festgestellt, daß Agglutinine allein von Paratyphus B-Bazillen, von anderen Bakterien jedoch gar nicht absorbiert wurden (Tabelle 4a). Ganz gleiche

Tabelle IVa.

Name der Immunsera	Ms. 62a (K. 1923)								
Name der Bakterien	Vor der Absorption	absorbiert mit							
		Ms. 8	Ms. 34	P.B. 1	P.B. 37	Ms. 59a	Ms. 62a	Ms. 60b	Ms. 65b
Ms. 8	50 000	50 —	50 —	5000	5000	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 34	50 000	50 —	50 —	5000	5000	50 —	50 —	50 —	50 —
P.B. 1	20 000	50 —	50 —	50 —	500	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 37	1 000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
Ms. 59a	50 000	50 —	50 —	5000	5000	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 62a	50 000	50 —	50 —	5000	5000	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 60b	50 000	50 —	50 —	5000	5000	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 65b	50 000	50 —	50 —	5000	5000	50 —	50 —	50 —	50 —

Versuche wurden mit dem Serum vom b-Form-Stamm ausgeführt. Dabei ergaben sich dieselben Resultate (Tabelle 4b). Ferner wurden die Sera von 2 Arten Mäusetyphusbazillen von unseren Bakterien ab-

Tabelle IVb.

Name der Immunsera	Ms. 60b (K. 1920)								
Name der Bakterien	Vor der Absorption	absorbiert mit							
		Ms. 8	Ms. 34	P.B. 1	P.B. 37	Ms. 59a	Ms. 62a	Ms. 60b	Ms. 65b
Ms. 8	20 000	50 —	50 —	2000	5000	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 34	20 000	50 —	50 —	2000 ±	2000	50 —	50 —	50 —	50 —
P.B. 1	500	50 —	50 —	50 —	200	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 37	500 ±	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
Ms. 59a	20 000	50 —	50 —	2000	5000	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 62a	20 000	50 —	50 —	2000	5000	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 60b	20 000	50 —	50 —	2000 ±	2000	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 65b	20 000	50 —	50 —	2000 ±	2000	50 —	50 —	50 —	50 —

sorbiert. Es ergab sich dabei, daß nicht nur absorbierte Stämme, sondern auch beide Typen Mäusetyphusbazillen und Paratyphus B-Stämme nicht mehr beeinflußbar waren (Tabelle 4c, d). Zuletzt wurden 2 repräsentierende Paratyphus B-Sera von den Stämmen der a- und b-Form absorbiert. Dabei ergab sich, daß Paratyphus B-Stämme darin noch

Tabelle IVc.

Name der Immunsera	Ms. 8 (K. 437)						
Name der Bakterien	Vor der Absorption	absorbiert mit					
		Ms. 8	Ms. 34	Ms. 59a	Ms. 62a	Ms. 60b	Ms. 65b
Ms. 8	20 000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 34	20 000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
P.B. 1	20 000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 37	20 000 ±	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
Ms. 59a	20 000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 62a	20 000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 60b	20 000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 65b	20 000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —

Tabelle IVd.

Name der Immunsera	Ms. 34 (K. 1280)						
Name der Bakterien	Vor der Absorption	absorbiert mit					
		Ms. 8	Ms. 34	Ms. 59a	Ms. 62a	Ms. 60b	Ms. 65b
Ms. 8	5000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 34	5000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
P.B. 1	100	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 37	100 ±	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
Ms. 59a	5000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 62a	5000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 60b	5000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 65b	5000	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —

sehr stark, dagegen die 2 Stämme der a- oder b-Form gar nicht agglutinierten (Tabelle 4e, f).

Tabelle IVe.

Name der Immunsera	P B. 1 (K. 706)						
Name der Bakterien	Vor der Absorption	absorbiert mit					
		P.B. 1	P.B. 37	Ms. 59a	Ms. 62a	Ms. 60b	Ms. 65b
P.B. 1	10 000	50 —	100 ±	1000	500	1000	1000
„ 37	10 000	50 —	50 —	1000 ±	500 ±	500	500
Ms. 8	10 000	50 —	100 ±	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 34	100	50 —	100 ±	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 59a	10 000	50 —	100 ±	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 62a	10 000	50 —	100	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 60b	200	50 —	100 ±	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 65b	200	50 —	100 ±	50 —	50 —	50 —	50 —

Tabelle IVf.

Name der Immunsera	P.B. 37 (K. 1843)						
Name der Bakterien	Vor der Absorption	absorbiert mit					
		P.B. 1	P.B. 37	Ms. 59a	Ms. 62a	Ms. 60b	Ms. 65b
P.B. 1	5000	50 —	50 —	1000	1000	1000	1000
„ 37	5000	50 —	50 —	5000	5000	5000	5000
Ms. 8	200	50 —	50 —	50 —	50 -	50 —	50 —
„ 34	100	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 59a	200	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 62a	200	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 60b	200 ±	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —
„ 65b	200 ±	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —	50 —

Nach diesen Ergebnissen kann man wohl annehmen, daß die Stämme der a- und b-Form mit den Mäusetyphusbazillen ganz identisch sein müssen.

Wenn man alle obigen Resultate zusammen betrachtet, so scheint die Annahme gerechtfertigt, daß die 7 Stämme, welche bei einer Nahrungsmittelvergiftung in Spaskaya gefunden wurden, nicht zu den Paratyphus B-Bazillen, sondern sicher zu den Mäusetyphusbazillen, und zwar zu denen der Aertryckform gehören. Das Resultat von Kajitsuka, daß sie von Paratyphus B-Bazillen kaum unterscheidbar waren, scheint dadurch zustande gekommen zu sein, daß bei ihm die a-Form überwog. In der Tat beobachtete auch ich, daß sie, als sie zuerst zu uns kamen, bedeutend mehr von der a-Form enthielten, wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist. Ferner kann man experimentell leicht nachweisen, daß die Stämme der reinen b-Form durch mehrmalige Umzüchtung immer mehr a-Form abgeben, wie oben auseinandergesetzt worden ist.

Literatur.

1) Bainbridge, Journ. of Pathol. a. Bacteriol. Vol. 13. 1909. p. 443. — 2) Aoki, Tohoku Journ. of exp. Med. Vol. 2. 1921. p. 131. — 3) Ders. u. Konno, Ibid. Vol. 2. 1921. p. 376. — 4) Sakai, Ibid. Vol. 3. 1922. p. 341. — 5) Ders., Ibid. Vol. 5. 1924. — 6) Konno u. Sakai, Ibid. Vol. 3. 1922. p. 333. — 7) Kajitsuka, Gunidan-Zasshi (Japanische militärärztl. Ztschr.) 1921. 113. 345. [Japanisch.]

Nachdruck verboten.

Ueber die Häufigkeit der Paratyphus B-Erkrankungen in Schleswig-Holstein.

[Aus dem Untersuchungsamt für ansteckende Krankheiten beim Hyg. Institut. Kiel (Leiter: Prof. Dr. Bitter).]

Von Dr. med. **Fritz Weigmann.**

Mit 1 Kurve im Text.

In den Arbeiten von Bernhard Fischer, Reiner Müller und Ludwig Bitter besitzen wir fortlaufende Untersuchungen über

die Häufigkeit typhöser Erkrankungen in Schleswig-Holstein und über das Verhältnis vom Typhus abdominalis zum Paratyphus B, die sich über mehrere Jahrzehnte erstrecken. Festeren Boden gewinnen diese Angaben allerdings erst mit dem Jahre 1903, von welchem Zeitpunkt an eine einigermaßen regelmäßige Einsendung des verdächtigen Materials seitens der Aerzte an das Untersuchungsamt erfolgte, und der bakteriologische und serologische Befund den amtlich gemeldeten Fällen gegenübergestellt werden konnte. Aus den Arbeiten der genannten drei Autoren geht hervor, daß eine Zunahme oder Abnahme der typhösen Erkrankungen seit dem Jahre 1899 im wesentlichen nicht stattgefunden hat. Faßt man immer 5 Jahre zusammen, so hält sich die jährliche Durchschnittszahl der amtlich gemeldeten Fälle annähernd in der gleichen Höhe, sie schwankt zwischen 350 und 500. Eine Ausnahme machen nur die Jahre, in denen eine größere Epidemie stattgefunden hat. Anders dagegen gestaltet sich das Verhältnis der beiden Formen typhöser Erkrankungen zueinander, des Typhus abdominalis zum Paratyphus B. Während Bernhard Fischer und Reiner Müller, d. h. bis zum Jahre 1913, den Prozentsatz des Paratyphus B an der Gesamtheit typhöser Erkrankungen (amtl. gemeldete Fälle) mit 7,9 berechnen, stellt Bitter, dessen Untersuchungen sich von 1914 bis 1919 erstrecken, mit Beginn des Krieges ein deutliches Steigen der Paratyphus B-Erkrankungen in Schleswig-Holstein fest. Die Höchstzahl wird im Jahre 1919 mit 21 Proz. der amtlich gemeldeten typhösen Erkrankungen erreicht.

Da es nun hinsichtlich der Epidemiologie einer Erkrankung nicht uninteressant sein dürfte, ihre Ausbreitung in einem bestimmten Landesteile über längere Zeiträume hin zu verfolgen, und das relativ häufige Vorkommen des Paratyphus B in Schleswig-Holstein eine günstige Gelegenheit dazu bietet, so sollen im folgenden die Untersuchungen der vorgenannten Autoren für die nächsten 5 Jahre fortgesetzt werden, also von 1920—1924. Um ein möglichst einheitliches Bild zu erhalten, ist die Berechnungsart, wie sie B. Fischer, R. Müller und L. Bitter zum Teil angewandt haben, beibehalten worden, nämlich die Beziehung der bakteriologisch und serologisch festgestellten Paratyphus B-Fälle auf die amtlich gemeldeten typhösen Erkrankungen. Was die Berechtigung und den Wert dieser Berechnungsart anbetrifft, so sei auf das von Bitter Gesagte verwiesen. Die so erhaltenen Zahlen stellen also Mindestzahlen dar. Aber auch die andere Berechnungsart, nämlich der Vergleich nur bakteriologisch oder serologisch festgestellter Paratyphus B- und Typhus-Erkrankungen miteinander, ist, wie es auch schon Bitter getan hat, berücksichtigt worden.

Es braucht wohl nicht besonders hervorgehoben zu werden, daß unter Paratyphus B-Erkrankungen nur der echte Paratyphus B, die typhöse Form, zu verstehen ist. Die durch das Bact. enteritidis Gärtner und Bact. enteritidis Breslau hervorgerufenen gastro-intestinalen Erkrankungen sind nicht mit einbezogen worden.

Ueber den weiteren Verlauf des Paratyphus B in Schleswig-Holstein gibt folgende Zusammenstellung (S. 398) Aufschluß.

Bitter hat mit dem Jahre 1919 den Höhepunkt der Paratyphus B-Erkrankungen mit 21 Proz. der amtlich gemeldeten typhösen Erkrankungen festgestellt. Diese Zahl wird im Jahre 1920 ungefähr beibehalten, sie ist nur um einen Bruchteil höher. Aber schon 1921 macht sich ein weiteres Ansteigen des Paratyphus B bemerkbar. In dieses

Tabelle I.

	Amtlich gemeldete Typhus- und Paratyphusfälle	Bakteriologisch und serol. festgestellte Paratyphusfälle	Prozent
1920	447	95	21,2
1921	447 356 ohne Epidemie	176 97 ohne Epidemie in Kiel und Eutin	39,4 bzw. 27,2
1922	362	78	21,5
1923	325	86	26,5
1924	484 351 ohne Epidemie	228 160 ohne Epidemie in Kiel-Gaarden	47,1 bzw. 45,6

Jahr, sowie in das Jahr 1924 fallen größere Epidemien in Kiel und Eutin bzw. Kiel-Gaarden, wodurch die hohen absoluten Zahlen zu erklären sind. Aber auch nach Abzug dieser Epidemien bleibt eine deutliche Zunahme bemerkbar. Nur das Jahr 1922 weist einen Rückgang der Paratyphus B-Erkrankungen gegenüber dem Vorjahre auf, der aber doch noch über der von Bitter für 1919 angegebenen und über der Zahl des Jahres 1920 bleibt, und bei Betrachtung der absoluten Zahlen nicht einmal groß ist, jedenfalls sich innerhalb des Rahmens der üblichen Jahresschwankungen hält. Mit dem nächsten Jahre setzt das Steigen wieder ein, es erreicht mit der absoluten Zahl allerdings noch nicht die beiden ersten Jahre. Das Jahr 1923 weist aber überhaupt die geringste Zahl typhöser Erkrankungen auf, und wenn man die Prozentzahl betrachtet, so tritt die Zunahme des Paratyphus B deutlich zutage. Den Höhepunkt der Paratyphus-Erkrankungen erreicht das Jahr 1924 mit 45,6 Proz. der amtlich gemeldeten Fälle nach Abzug der Epidemie in Kiel-Gaarden.

Noch deutlicher tritt die Zunahme des Paratyphus B auf Kosten des Typhus abdominalis in Erscheinung, wenn man die Zahlen der bakteriologisch und serologisch festgestellten Typhus- und Paratyphus B-Fälle einander gegenüberstellt.

Tabelle II.

	Bakteriologisch und serol. festgestellte Typhusfälle	Paratyphusfälle	Prozent
1920	260	95	36,5
1921	180	176 97 ohne Epidemie	97,7 bzw. 53,9
1922	171	78	45,6
1923	145	86	59,3
1924	133	228 160 ohne Epidemie	171,4 bzw. 120,3

Von 1920—1924 findet eine stetige Abnahme des Typhus abdominalis statt. Beim Paratyphus B zeigt das Jahr 1922 wieder den leichten Rückgang gegenüber dem Vorjahre, während im nächsten Jahre die Prozentzahl das starke Ansteigen des Paratyphus B viel deutlicher in Erscheinung treten läßt als die erste Berechnungsart. Im Jahre 1924 gar übertrifft die Zahl der Paratyphuserkrankungen auch nach Abzug der Epidemie in Kiel-Gaarden bei weitem die Erkrankungen an Typhus abdominalis. In diesem Jahre fanden, abgesehen von der genannten Epidemie, die über 100 gemeldete Fälle umfaßte, von denen 68 bakteriologisch und serologisch festgestellt wurden, in der ganzen Provinz zahl-

reiche Erkrankungen an Paratyphus B statt, die an vielen Orten, z. B. Husum, Eutin u. a., den Charakter kleiner Epidemien annahmen. Da diese lokalen Anhäufungen jedoch jeweils die Zahl von 20 Fällen nicht erreichten, wurden sie als Epidemie nicht berücksichtigt und in Abzug gebracht.

Der Unterschied der beiden Berechnungsarten, auf den Bitter eingehend hingewiesen hat, tritt auch hier wieder deutlich zutage. Das Prozentverhältnis der bakteriologisch und serologisch festgestellten Typhus- und Paratyphus-Erkrankungen ist rund um das Doppelte höher als bei Bezugnahme der festgestellten Paratyphusfälle auf die amtlich gemeldeten typhösen Erkrankungen. Der außerordentlich hohe Prozentsatz im ersteren Falle erklärt sich wohl zum Teil damit, daß die Paratyphus B-Bakterien im allgemeinen leichter nachweisbar sind als die Erreger des Unterleibstyphus. Aus eben diesem Grunde habe ich aber schon die bakteriologisch und serologisch festgestellten Fälle zum Vergleich herangezogen und nicht allein die durch Züchtung gewonnenen Ergebnisse. Jedenfalls scheint mir die Bezugnahme auf die gemeldeten Fälle ein gleichmäßigeres und weniger Fehlerquellen enthaltendes Bild zu geben. Die Meldungen über Typhus dürften ziemlich vollständig erfolgen. Immerhin ist die andere Berechnungsart insofern von Wert, als auch sie die ständige Abnahme des Typhus abdominalis zugunsten des Paratyphus anzeigt.

In diesem Zusammenhang dürfte es interessieren, ein wie hoher Prozentsatz der gemeldeten typhösen Erkrankungen bakteriologisch oder serologisch festgestellt wurde.

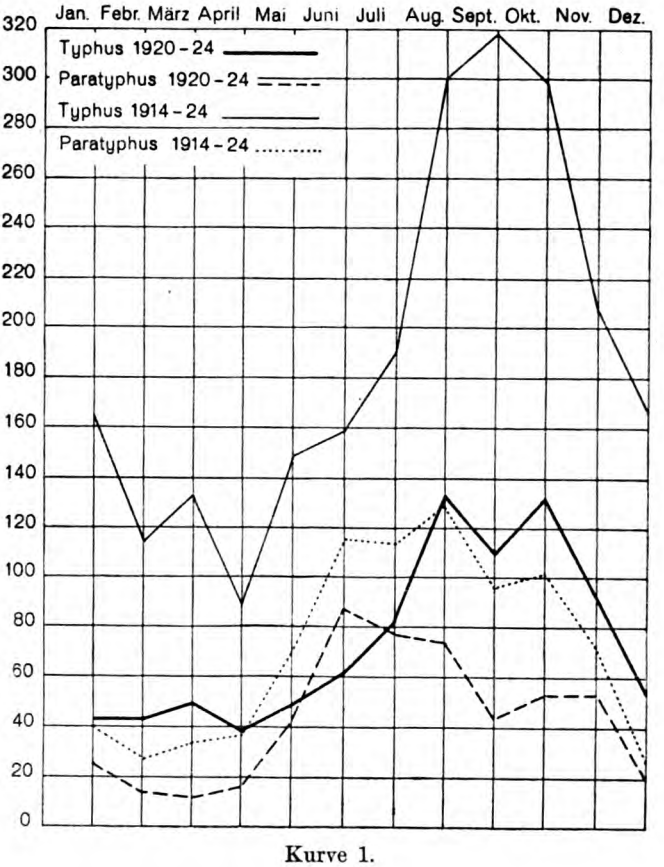
Tabelle III.

Typhus und Paratyphus	Amtlich gemeldete Fälle	Bakteriol. oder serol. festgestellte Erkrankungen		Nur bakteriologisch festgestellte Erkrankungen	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
1920	447	355	79,4	218	48,8
1921	447	356	79,6	231	51,7
1922	362	249	68,9	165	45,6
1923	325	231	71,1	159	48,9
1924	484	361	74,6	258	53,3

Die Zahl der bakteriologisch und serologisch festgestellten Erkrankungen schwankt, wie man sieht, zwischen 70 und 80 Proz. der gemeldeten Fälle. Die genaue Durchschnittsziffer beträgt 73,4 Proz. Das deckt sich ziemlich genau mit den von Bitter angegebenen Prozenten, deren Durchschnittsziffer 72,15 Proz. ausmacht. Durch Züchtung festgestellt wurden rund 50 Proz. Würde diese Berechnungsart auf die Paratyphuserkrankungen beschränkt, so erhielte man einen Prozentsatz von nahezu 100. Das erklärt sich ohne weiteres daraus, daß die Meldungen über Paratyphus B in den meisten Fällen wohl erst auf Grund der bakteriologischen oder serologischen Diagnose erfolgen, es sei denn, daß zu Zeiten einer Epidemie die Aerzte durch die bakteriologische Diagnose der ersten Fälle aufmerksam gemacht, schon von sich aus die klinische Diagnose Paratyphus B stellen. Jedenfalls ist aber die in früheren Jahren von Bitter beobachtete Tatsache, daß die durch Züchtung und Agglutination festgestellten Paratyphus B-Fälle die gemeldeten

an Zahl bedeutend übertreffen, nicht mehr zu konstatieren. Die Aerzte in der Provinz sind jetzt durch die Feststellungen des Untersuchungsamtes von dem häufigen Vorkommen dieser Erkrankung unterrichtet, und die Einsendungen erfolgen seit den letzten Jahren fast immer „zur Untersuchung auf Typhus oder Paratyphus".

Bitter hat für die Jahre 1914—1919 die Akme der Paratyphus B- und Typhus-Erkrankungen in Schleswig-Holstein ermittelt und aus dem ungefähren Zusammenfallen der jahreszeitlichen Verteilung auf eine ähnliche Verbreitungsart der Erreger dieser Krankheiten oder auf ihre



Kurve 1.

Empfänglichkeitsbeeinflussung durch die Witterung geschlossen. Der Höhepunkt der Typhuserkrankungen fällt bei ihm in den September, der Paratyphuserkrankungen in den Monat August. Für 1920—1924 habe ich in gleicher Weise eine Kurve der jahreszeitlichen Verteilung aufgestellt. Es wurde als Grundlage für die Kurve wieder die Anzahl der bakteriologisch oder serologisch festgestellten Fälle benutzt. Die erwähnten Epidemien in Kiel und Eutin bzw. Kiel-Gaarden wurden ausgeschaltet, da sie den Gang der Kurve widersinnig beeinflussen würden.

Die Kurve zeigt, mit der von Bitter aufgestellten verglichen, eine Verschiebung der Akme nach links. Der Höhepunkt des Paratyphus B

fällt nicht mehr in den August, sondern bereits in den Juni. Jm Juli und August findet allerdings nur ein mäßiger Abfall statt und erst im September läßt die Häufigkeit der Erkrankungen bedeutend nach. Man könnte also mit einer gewissen Berechtigung von einer Höhenlinie sprechen, die sich durch die drei wärmsten Monate hinzieht. Der Höhepunkt des Typhus hat sich ebenfalls verschoben, und zwar um einen Monat. Statt in den September, fällt er bereits in den August. Die Kurve weist jedoch nach einem kleinen Abfall im September einen zweiten, gleichen Höhepunkt im Oktober auf. Wir haben also einen doppelten Gipfel vor uns oder mit einer gewissen Einschränkung wieder eine Höhenlinie. Eine Ursache für diese veränderte jahreszeitliche Verteilung ist nicht ersichtlich. Jmmerhin fällt die Höchstzahl der Erkrankungen an Typhus und Paratyphus mit 324 bzw. 193 Fällen, entsprechend den Angaben von Bitter, noch in das dritte Vierteljahr, was die Annahme einer ähnlichen Verbreitungsart der Erreger bestätigen würde.

Vergleicht man hiermit die jahreszeitliche Verteilung der Fleischvergiftungen (gezählt sind die einzelnen größeren oder kleineren Gruppenerkrankungen bzw. isolierten Fälle), so kommt man zu folgendem Ergebnis für die Jahre 1920—1924:

Januar 2, Februar 3, März 1, April 1, Mai 6, Juni 4, Juli 5, August 6, September 4, Oktober 2, November 2, Dezember 3.

Es zeigen sich also keine größeren Schwankungen innerhalb der Jahreszeiten. Die meisten Vergiftungen fallen in den Mai und August mit je 6. Die warmen Monate weisen zwar insgesamt eine größere Anzahl Vergiftungen auf als die kalten. Aber Dezember und Februar zeigen immerhin noch je drei Gruppenerkrankungen. Nach Vierteljahren zusammengefaßt, überwiegt allerdings wie bei Typhus und Paratyphus das 3. Vierteljahr mit 15 Erkrankungen, während das 2. nur 11 aufweist. Das steht im Widerspruch mit Bitters Feststellungen für die Jahre 1912—1919, in denen das 2. Vierteljahr mit 15 Vergiftungen das 3. mit 11 übertrifft. Ein Ueberblick über wenige Jahre besagt natürlich bei so geringen Zahlen nicht viel. Faßt man daher die Jahre 1912—1924 zusammen, so ergibt sich eine gleichbleibende Häufigkeit der Fleischvergiftungen durch das ganze Sommerhalbjahr hindurch, die im Winterhalbjahr um rund 50 Proz. sinkt. Zeichnet man dementsprechend eine Kurve des Typhus und Paratyphus für die Jahre 1914—1924 (in Tabelle IV eingetragen), so fällt der Höhepunkt des Typhus wieder wie bei Bitter in den September, des Paratyphus in den August. Die Fleischvergiftungskurve würde sich also, berechnet auf einen fast gleich langen Zeitraum, wesentlich von der des Typhus und Paratyphus unterscheiden.

Ueber die Gründe für das starke Ansteigen der Paratyphus B-Erkrankungen in Schleswig-Holstein lassen sich nur Vermutungen aufstellen. Unseren Beobachtungen nach zu urteilen, scheint der Paratyphus B mehr zum Dauerausscheidertum zu führen als der Unterleibstyphus. Da nun der Paratyphus klinisch im allgemeinen weniger schwer verläuft als der Typhus, so werden sich eine Anzahl leichter Erkrankungen der ärztlichen Behandlung und Beobachtung überhaupt entziehen. Unter diesen können unbekannte Dauerausscheider entstehen, die zu immer neuen Infektionen Anlaß geben. Derartige Fälle haben wir bei der Aufspürung von Dauerausscheidern wiederholt beobachtet. Die Zahl solcher

unbekannter Dauerausscheider würde im Laufe der Zeit zunehmen können und damit auch das Steigen der Paratyphus B-Erkrankungen erklärt werden. Wie gesagt, ist dies nur eine Vermutung, aber meines Erachtens eine mögliche Erklärung, die durch die oben geschilderten Beobachtungen immerhin eine gewisse Stütze erhält. Interessant ist iedenfalls auch die Tatsache, daß der Unterleibstyphus in den letzten 5 Jahren in Schleswig-Holstein stark zurückzugehen scheint.

Literatur.

Fischer, Bernhard, Untersuchungen über den Unterleibstyphus in Schleswig-Holstein. (Klin. Jahrb. Bd. 15. 1905. S. 92.) — Müller, Reiner, Fleischververgiftungen durch Bakterien der Paratyphus-Enteritis-Gruppe. (Münch. med. Woch. 1914. S. 471.) — Bitter, Ludwig, Zur Epidemiologie der durch Paratyphus B-Bakterien verursachten Erkrankungen in Schleswig-Holstein. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85. H. 2.)

Nachdruck verboten.

Die Besredkasche Tuberkulosereaktion.

Erfahrungen aus einer Tuberkulosefürsorgestelle in Moskau.

I. Mitteilung.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des Staatl. Chemo-Pharmaz. Forschungsinstituts (Leiter: Prof. O. Steppuhn) und des Chemisch-Bakteriologischen Instituts der Aerzte (Vorsteher: A. Kowarski) in Moskau.]

Von Dr. **Wladimir Wariszczew** und Dr. **Selma Jakubowitsch.**

Summierte man einmal die Resultate der Literatur über die Besredkasche Reaktion bei Lungentuberkulose, so würde man dabei auf ziemlich große Widersprüche stoßen. Französische Autoren geben meist an, daß die Reaktion in 90—95 Proz. der Fälle klinisch bestätigt wird und dementsprechend als wertvolles diagnostisches Verfahren betrachtet werden müsse. (Besredka und Manoukhine, Dubain und Jupille, Fried, Rieux und Baß, Kuß und Rubinstein usw.). Deutsche Forscher, die auf demselben Gebiete arbeiteten, bekamen selten so erfreuliche Resultate und sprechen sich deswegen etwas zurückhaltender aus (Gutfeld und Weigert 70 Proz., Seifert 70 Proz., Schloßberger, Hartoch, Lusena und Prigge 61 Proz., Lydia Rabinowitsch-Kempner 82 Proz., Takenomata usw.).

Die russischen Autoren stehen zwischen beiden Ansichten (Platonow 70 Proz., Günsburg und Schuwalow 92,5 Proz., Togunowa 91—100 Proz.).

Leider hat sich in der Praxis die Reaktion von Besredka noch nicht eingebürgert und der praktische Arzt steht ihr heutzutage noch ziemlich skeptisch gegenüber.

Unser Ziel war, die Reaktion bezüglich ihrer technischen Möglichkeiten zu prüfen und sie selbst an klinisch mittelschwerem Material zu kontrollieren. Was die technische Seite betrifft, so machten wir

zwecks gegenseitiger Kontrolle 2 parallele Reaktionen, und zwar jede für sich; meistens auch an demselben Tage mit ganz gleicher Methodik, aber in 2 ganz verschiedenen Laboratorien. Als Antigenstamm diente ein alter Laboratoriumsstamm, den wir in 3 Modifikationen angewendet haben, und zwar: 1) Tbc-Kultur im Eiernährboden, 2) Tbc-Kultur vom Eiernährboden gewaschen und in 0,85 Proz. Kochsalz aufgenommen, und 3) Methylalkoholextrakt nach Boquet und Nègre. Dabei muß gleich erwähnt werden, daß das Antigen nach Boquet und Nègre den großen Vorzug hat, daß es die Luessera fast völlig unbeeinflußt läßt während im übrigen die Resultate meistens parallel gingen.

Der als Antigen nach Gutfeld und Weigert unbeimpfte Eiernährboden gab stets Hämolyse. Wir stellten den Versuch nach der üblichen Bordet-Wassermann-Methode an, nur aber verwandten wir dabei titriertes Komplement. Im Hauptversuch muß nicht weniger als die anderthalbfache Komplementtiterdose genommen werden, da die Tbc-Sera eine ziemlich starke Eigenhemmung ausüben können. Die Calmette-Massol-Methode erschien uns umständlich.

Unser Material umfaßt ungefähr 200 Fälle, von denen 145 klinisch vollkommen durchuntersucht worden sind. Alle Sera wurden auch parallel mit dem Wassermann-Lues-Antigen untersucht und die Wa-positiven Sera von der Rechnung abgezogen. Das Material ist nach der in Rußland üblichen Weise in Tbc-kompensierte A, subkompensierte B, und dekompensierte C- eingeteilt. Das I., II. und III. nach Turban. also, AI heißt: Tbc-kompensierte Turban I.

Tabelle.

	Im ganzen							
	++++	+++	++	+	positiv	Proz. positiv	negativ	Summe
AI AII	3	—	1	4	8	19,2 Proz.	34	42
BI	6	2	5	9	22	59,8 „	15	37
BII BIII	3	2	3	1	9	60,0 „	6	15
Tbc. ohne klin. Charakteristik	2	—	2	1	5	27,7 „	13	18
Tbc.-Verdacht	1	3	3	1	8	24,2 „	25	33

Wie man aus der Tabelle sieht, gibt BI und BII die höchsten Zahlen der positiven Reaktion. Insgesamt sind das 25 subkompensierte Fälle, die rund in 60 Proz. positiv ausfielen. Die Rubrik AI und AII, d. h. inaktive, fibröse Prozesse, zeigen nur 19,2 Proz. positiv. Die Gruppe „Tbc-verdächtige“ und „Tbc ohne klinische Charakteristik“ läßt zwar wenig Schlußfolgerungen ziehen; sie sind jedoch für das fließende Straßenmaterial unserer Verhältnisse ziemlich charakteristisch.

Wollten wir jetzt auf Grund unserer Ergebnisse an die Besredka-Tbc-Reaktion wie bei jeder anderen Seroreaktion die 2 Kardinalforderungen stellen, und nach ihrer Spezifität und Empfindlichkeit fragen, so müssen wir zwar ihre Spezifität im hohen Grade bestätigen, können aber ihre Empfindlichkeit bis jetzt nur als mangelhaft betrachten.

Unser Material ist zwar nicht allzu groß, aber klinisch und serologisch genau durchuntersucht; wir hatten auch nur einen Antigenstamm zur Prüfung. Wir hoffen aber, an dieser Stelle bald über unsere weiteren Erfahrungen berichten zu können.

Literatur.

1) Besredka, Ztschr. f. Immunitätsf. Orig. Bd. 21. 1914. — 2) Ders. u. Manoukhine, Compt. Rend. Soc. d. Biol. T. 76. 1914. p. 180. — 3) Boquet et Nègre, Ibid. T. 83. 1920. — 4) Calmette et Massol, Ibid. T. 73. 1912. — 5) Dubain et Jupille, Ann. Pasteur. 1915. — 6) Fried, Compt. Rend. Soc. de Biol. T. 83. 1920. No. 29. — 7) Guttfeld u. Weigert, Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Orig. Bd. 90. 1923. H. 3. — 8) Günsburg u. Schuwalow, Ibid. Bd. 91. 1924. H. 6. — 9) Kuss et Rubinstein, Bull. et Mém. Soc. méd. des Hôpit. de Paris. 1914. — 10) Platonow, „Woprosy Tuberkulosa" (russisch). 1923. H. 1. — 11) Rabinowitsch-Kempner, Dtsch. med. Woch. 1922. Nr. 12. — 12) Rieux et Bass, Annal. Pasteur. 1921. No. 6. — 13) Schloßberger, Hartoch, Lusena u. Prigge, Dtsch. med. Woch. 1924. Nr. 26. — 14) Seifert, Klin. Woch. 1923. Nr. 33. — 15) Takenomata, Schweizer med. Woch. 1923. Nr. 5. — 16) Togunowa, Arch. f. klin. u. exper. Med. (russisch). 1924. Nr. 5—6.

Nachdruck verboten.

Zur Frage des Einflusses der Strahlenenergie auf das Wachstum der Tuberkelbazillen in vitro.

Von Prof. Dr. **M. Friedland,**
Leiter der Orthopädischen Klinik des Staatlichen Institutes zur Aerztefortbildung zu Kasan (Rußland).

1) Ziel der Arbeit: Wenn auch die Literatur reich an Arbeiten ist, welche der Frage des Einflusses verschiedener Arten der Strahlenenergie auf Mikroorganismen überhaupt gewidmet sind, so sehen wir doch, daß die Tuberkelbazillen (wir betrachten hier nur die Versuche mit reinen Kulturen, aber nicht mit Tuberkelsputum) in sehr wenigen Arbeiten in dieser Hinsicht untersucht worden sind. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in den Schwierigkeiten, welche mit der Kultivierung der Tuberkelbazillen in vitro verbunden sind: Launenhaftigkeit der Bazillen in bezug auf die Nahrungssubstanz, langsamer Wuchs, leichte Verschmutzung der Tuberkelkultur und ähnlichen Bedingungen. Dieses veranlaßte mich zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Arten der Strahlenenergie, und zwar des Sonnenlichtes, Bogenlichtes, einzelner Teile des Lichtsprektrums, künstlichen Höhensonnenlichtes, Röntgen- und Radiumstrahlen auf Tuberkelbazillen in vitro[1]).

2) Bakteriologische Technik. Zur Züchtung der Tuberkelbazillen diente mir die Substanz von Wassermann, deren Zubereitung ich etwas modifiziert habe, und zwar nahm ich 15 ccm Pferdeserum, 30 ccm Aq. destill. und 3 ccm Glyzerin. Diese Mischung wurde 15 Min.

1) Der Hauptteil meiner Arbeit wurde im Bakteriologischen Institut der Kasaner Universität unter liebenswürdigem Beistand des Direktors des Instituts, Prof. W. Aristowsky, ausgeführt, die Exposition der Kulturen in bezug auf Bogenlicht und filtriertes Licht im Laboratorium des Physiko-Mathematischen Fakultät der Kasaner Universität mit Hilfe des Assistenten B. Smirnitzky. Das Radium für meine Versuche wurde mir gütigst überlassen von dem Direktor der Gynäkologischen Klinik der Kasaner Universität, Prof. W. Grusdeff. Allen erwähnten Herren sage ich meinen besten Dank. Was die „Höhensonne" und Röntgenstrahlen betrifft, so benutzte ich dieselben in der von mir geleiteten Orthopädischen Klinik des Institutes zur Aerztefortbildung zu Kasan.

im Wasserbad gekocht, das durch teilweise Absonderung des Eiweißes erhaltene Sediment abfiltriert und nachher das Filtrat im Autoklaven bei 115° während 20 Min. sterilisiert. Unsere Art der Zubereitung der Nahrungssubstanz unterscheidet sich von der des Autors dadurch, daß 1) wir nicht 0,8 ccm Nutrosa hinzufügen (weil dieses Präparat uns fehlt). 2) Wir filtrieren die Mischung, nachdem wir dieselbe in einem Wasserbad gekocht hatten (um die Trübung der Substanz zu beseitigen, welche die Beobachtung der Tuberkelbazillen erschwert, hauptsächlich durch ihren weißlichen Anfangswuchs) und schließlich 3) sterilisierten wir die Substanz im Autoklaven unter Druck (dies beschleunigt den Prozeß der Zubereitung der Nährsubstanz und garantierte ihr eine größere Sterilität in Vergleich zur unterbrochenen Sterilisation mit flüssigem Dampf nach Wassermann).

Die erhaltene Flüssigkeit mischte ich nach Wassermann halb mit 2 Proz. Agar, welcher 1 Proz. Pepton enthielt und füllte dann mit dieser Substanz die Probiergläser (schräg) oder Petri-Gläser.

Für die Versuche benutzte ich Tuberkulose, ausschließlich des Typus humanus, deren Grundstamm aus tuberkulosem Sputum 1 Jahr vorher abgesondert worden war. Eine Platinschlinge voll Kultur wurde leicht in die Nährsubstanz eingerieben. Das Wachstum zeigte noch bei 35—36° C einzelne weiße Punkte, oder gewöhnlich am 6. Tage ein weißliches, zartes Häutchen (Spinngewebe). Am 10.—12. Tage wurde das Wachstum üppig und es bildete sich auf der Oberfläche der Nährsubstanz eine dichte weiße Haut. Während dieser Zeit erfolgte meistens der Vergleich der Kontrollsaaten (die ausschließlich im Dunkeln aufgewachsen waren) mit den Versuchssaaten (die vorher bestrahlt waren). In einigen Fällen wurde die Vergleichung am 6.—7. Tage nach dem Versuche vorgenommen, um die Berechnung der einzelnen Kolonien zu erleichtern.

Die Tuberkelbazillen wurden bestrahlt in den nächsten 1—3 Std. nach der Aussaat. In den Fällen, wo die nicht besäte Nährsubstanz bestrahlt wurde (um festzustellen, ob die chemischen Veränderungen der Nährsubstanz auf das Wachstum der Mikroben Einfluß haben), erfolgte die Aussaat in den nächsten 1—3 Std. nach der Exposition. Die Saaten von Kontroll- und Versuchsgläsern, ebenso die Aufbewahrungsbedingungen bis zum Moment, wo sie in den Thermostat gesetzt wurden, waren vollkommen identisch. Die Färbung der Tuberkelbazillen erfolgte nach Ziehl-Neelsen.

3) Einfluß des direkten Sonnenlichtes auf das Wachstum der Tuberkelbazillen in vitro.

Die ersten Forschungen dieser Art nahm R. Koch (1890) vor:

Die Tuberkelbazillen, welche in seinen Versuchen auf Rinderserum erhalten worden waren, gingen zugrunde unter dem Einflusse der direkten Sonnenstrahlen in einigen Min. bis zu einigen Std., je nach der Stärke der Kulturschicht. Bei Pansini, desgleichen bei Strauss, gingen die Tuberkelbazillen in Glyzerinbouillon nach 2 Std. langer Sonnenbeleuchtung ein. Bei den Versuchen von Strauss gingen die auf Glyzerinbouillon gezüchteten Tuberkelkulturen, die in dünner Schicht auf das Glas geschmiert waren, $^1/_2$ Std. nach der Insolation zugrunde. Di-Donna exponierte 1 Monat alte Agartuberkelkulturen der Sonne, wobei die Probiergläser in einem Kasten mit Glasdeckel und vorderer Glaswand sich befanden, und der Kasten selbst in einem anderen ebensolchen Kasten sich befand, und zwischen den 2 Kästchen zirkulierte Wasser von 14—15° zur Kühlung.

Die so angestellten Versuche ergaben den Tod der Tuberkelbazillen erst nach 8 vollen Tagen, in den Sommermonaten stattfindender Insolation. Zu bemerken ist noch, daß in den Versuchen von Di-Donna die Wirkung der Sonnenstrahlen

stark geschwächt worden ist: 1) durch das doppelte Glas der Kästen, 2) das Wasser und 3) durch das Glas der Probiergläser und die Masse der Kulturschicht, i. e. durch Faktoren, welche die Wirkung von chemischen und Wärmestrahlen auf die Kultur größtenteils ausschlossen. Weinzirl schmierte eine dünne Schicht einer in physiologischer Lösung suspendierten Tuberkelkultur auf Papier, trocknete den Anstrich und beobachtete, daß der Tod der Bazillen nach 1—10 Min. Insolation erfolgte. Treskinskaja erhielt volle Sterilisation der Peptonbouillon-Tuberkelkulturen nach 3std. Insolation in der Höhe von 1560 m (Davos, Schweiz), nach 4std. in der Höhe von 903 m (Wald, Schweiz) und nach 5 Std. auf dem Meeresstrand (Petersburg, Rußland). Jessionek schmierte sehr virulente Tuberkelkultur auf seinen Unterarm und exponierte ihn um die Mittagsstunde unter geraden Strahlen der Maisonne in Gießen (180 m): die Bazillen waren nach $^1/_2$ Std. tot.

Die bakterizide Wirkung des Lichtes wird durch verschiedene Autoren nicht nur als Resultat der direkten Wirkung auf die Bazillen erklärt, sondern auch als Folge der photochemischen Veränderungen der Nährsubstanz: einfaches Sauerwerden (Roux, Kotlar), Ozonisierung (Heissler, Chmelewsky), oder Entwicklung von H_2O_2 in der Nährsubstanz (Richardson, Dieudonné. Nach Pilnoff). Leider figurierten die Tuberkelbazillen in keinem dieser letzten Versuche.

Einzelne Autoren legen großes Gewicht auf die Erhöhung der Temperatur bei Belichtung (Santori, Heissler, Bang u. a.).

Meine Versuche, die ich im Mai—Juli 1924 machte, bestanden darin, daß ich 10 Probiergläser, die frisch mit Tuberkelbazillen besät waren, zur Kontrolle im Dunkeln ließ und 10 ebensolche Probiergläser um $11^1/_2$ Uhr auf ein weißes Fensterbrett im 3. Stock bei weit geöffnetem Fenster unter perpendikulär fallende helle Sonnenstrahlen legte. Um festzustellen, ob die Sonnenstrahlen auf die Saat oder die Nährsubstanz wirken, legte ich noch 10 Probiergläser dazwischen. Nach der Exposition, die in den Versuchen 40—75 Min. dauerte, bei absolut klarem Himmel, unternahm ich sofort die Besäung der Tuberkelbazillen in die Probiergläser mit insolierter Nährsubstanz, worauf ich alle 30 Probiergläser in den Thermostat stellte. Am 11. Tage verglich ich das Wachstum in den Probiergläsern, wobei das in den Kontrollprobiergläsern (in allen fand ich eine dicke, dichte Haut) gleich 100 Proz. gerechnet wurde. Die Resultate dieser Versuche zeigt Tabelle I:

Tabelle I.

N-Versuch	Datum	Relative Feuchtigkeit	Druck in mm kg	Temperatur nach C	Dauer der Exposition in Minuten	Wuchs der Tuberkelbazillen in Probiergläsern	
						mit insolierter Saat	mit insolierter Nahrungssubst.
I	20. 6.	60	757	29°	40	20 Proz.	90 Proz.
II	30. 7.	44	758	35°	60	5 „	75 „
III	10. 6.	42	760	24°	60	steril	90 „
IV	14. 5.	38	759	24°	75	„	75 „
V	11. 6.	38	759	28°	75	„	75 „

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß 1) volle Sterilisation der Tuberkelsaat nach 1—$1^1/_2$std. Insolation eintritt, 2) daß eine leichte Wirkung auf das Wachstum der Bazillen durch die Aenderungen, welche in der Nährsubstanz durch die Sonnenstrahlen eintreten, erfolgte. 3) Da die Probiergläser aus Glas und nicht aus Quarz waren, zeigt sich die Bakteridizität des Sonnenlichtes (ebenso die Veränderungen, welche von ihm in der Nährsubstanz hervorgerufen werden) sehr deutlich, und zwar auch ohne ultraviolette Strahlen. 4) Leichte Schwankungen der Temperatur während der Insolation haben an und für sich keine große Wirkung auf das Wachstum der Tuberkelsaat.

4) Einfluß des künstlichen Lichtes (Bogenlichtes) und einzelner Teile des Spektrums auf das Wachstum der Tuberkelbazillen in vitro. In der mir zugänglichen Literatur konnte ich nur 1 Untersuchung finden über die Wirkung des künstlichen Lichtes auf Tuberkelkulturen und zwar die von Kayser. Leider war mir das Original nicht zugänglich, so daß ich die Daten nach Mesernitzky (Physiotherapie. T. I. 1916. S. 320. Petersburg) anführe: Kayser unternahm folgende Versuche mit Hilfe des elektrischen Lichtes: 1) 3 Kulturen waren dem hellblauen Lichte auf 5 m Entfernung während 3 Min. exponiert. 2) Reine Kulturen wurden in den Probiergläsern am Rücken des Kranken angebracht, welcher von vorne während $^1/_2$ Std. täglich beleuchtet wurde, und zwar 6 Tage lang. 3) Einige Kulturen wurden dem Lichte exponiert, aus welchen die Wärmestrahlen entfernt waren. Durch Impfungen auf Meerschweinchen wurde bewiesen, daß hellblaues, violettes und ultraviolettes Licht die Tuberkelbazillen tötet.

In meinen Versuchen, die ich im Winter 1923/24 machte, bediente ich mich des Bogenlichtes (11 A, 150 V), 1500 N. K. stark und monochromatischen Lichtfilters Wratten und Wainwright (gefärbte Gelatine, die sich in einer dünnen Schicht zwischen 2 Quarzplatten befand) für rote ($\lambda = 650\ \mu\mu$), grüne ($\lambda = 595—555\ \mu\mu$) und violette ($\lambda = 470—400\ \mu\mu$) Strahlen; für ultra-violette Strahlen ($\lambda = 350—300\ \mu\mu$) diente mir der Uviol-Filter von Zeiß (3 parallele Quarzplatten, die 2 Leeren begrenzen, von denen die eine mit 20proz. Lösung von Cuprum sulfuricum und die andere mit einer schwachen Lösung von Nitrosodimethylamin gefüllt waren). Die folgerechte Lage und Entfernung zwischen den zentralen Punkten der unteren Flächen der Vorrichtungen waren folgende: Voltabogen — 14 cm — Quarzkondensor, der die Strahlen in einem parallelen Bündel einsammelt — 5 cm — Lichtfilter — 3 cm — Wasserkühler mit Glaswänden — 8 cm — Probierglas (Petri-Schale) mit Saat und daneben Thermometer. Insgesamt war die Entfernung vom Voltabogen bis zur Oberfläche der Nährsubstanz (resp. Saat) 30 cm. Der Wasserkühler wurde nur in Fällen aufgestellt, wenn die Versuche mit Wärmestrahlen, i. e. roten und grünen Strahlen, gemacht wurden. In den Versuchen mit ultravioletten Strahlen benutzte ich ausschließlich Petri-Schalen und als oberen Deckel für dieselben die einzige Quarzplatte, die in meinem Besitz war. Der Mangel an Quarzgeschirr hatte zur Folge, daß meine Forschungen mit ultravioletten Strahlen zum größten Teil durch Verunreinigungen der Saaten durch andere Mikroorganismen (Sarcinae, Bac. subtilis, Schimmel) verdorben wurden, weshalb ich in dieser Beziehung nur 2 Versuche anstellen konnte.

Die Dauer der Exposition betrug in allen Versuchen 40 Min. Die Temperatur, welche vor Beginn der Bestrahlung gleich 10—11° C war, erhöhte sich am Schlusse der Exposition um nicht mehr als 0,5—1,5°. Für jede Exposition benutzte ich bei jeder Art von Strahlen 2—3 Probiergläser.

Im ganzen wurden 9 Versuche gemacht, die folgende Tabelle (S. 408) illustriert.

Die Tabelle läßt erkennnen, daß 1) alle Arten der Strahlen des Bogenlichtes im ganzen, ebenso wie einzelne Teile des Spektrums, sich auf Tuberkelkulturen bakterizid erwiesen, und 2) die größte Bakteridi-

Tabelle II.

N-Versuch	Weißes (nicht filtriertes) Licht	Uviol-strahlen (λ = 300 bis 350 $\mu\mu$)	Violette Strahlen (λ = 400 bis 470 $\mu\mu$)	Grüne Strahlen (λ = 555 bis 595 $\mu\mu$)	Rote Strahlen (λ = 650 $\mu\mu$)	Kontrolle (nicht beleuchtete Probier-gläser)
I	—	—	Dichter Wuchs; dicke Haut	Wuchs mit dünnem Häutchen	—	Dichter Wuchs; sehr dicke Haut
II	Schwacher Wuchs; starke Entfärbung	Sehr schwacher Wuchs; kaum bemerkbares Häutchen	Dichtes Häutchen	—	Schwacher Wuchs; dünnes Häutchen	Dichter Wuchs
III	—	—	152 Kolonien; normale Färbung	25 Kolonien; geschwächte Färbung auf den Enden der Bazillen	48 Kolonien; geschwächte Färbung auf den Enden der Bazillen	500 Kolonien; normale Färbung
IV	—	Geringer Wuchs, — „Schatten"	—	—	—	Starker Wuchs; dicke Haut
V	Steril	—	—	—	Steril	Ueppiger Wuchs
VI	3 Kolonien; starke Kernheit	—	7 Kolonien; Kernheit	—	5 Kolonien; starke Kernheit	12 Kolonien; normales Aussehen der Bazillen
VII	18 Kolonien[1])	—	140 Kolon.	12 Kolonien	40 Kolonien	190 Kolon.
	5 „ [2])	—	11 „	5 „	8 „	25 „
VIII	11 Kolonien	—	15 Kolonien	7 Kolonien	11 Kolonien	19 Kolonien
IX	Sehr schwacher Wuchs; 20 Proz. pigmentiert	—	Dicker Wuchs; 15 Proz. pigmentiert	Mittelwuchs; 25 Proz. pigmentiert	Schwacher Wuchs; 10 Proz. pigmentiert	Dichter Wuchs; 15 Proz. pigmentiert

zität weißes (unfiltriertes) Licht grüne und ultraviolette Strahlen bewirken, schwächer aber rote und violette Strahlen wirken.

5) Einfluß des künstlichen Höhensonnenlichtes auf das Wachstum der Tuberkelbazillen in vitro. In der Literatur habe ich gar keine Angaben in dieser Beziehung finden können. Ich brauchte die Bach-Lampe (Quarzlampengesellschaft, Hanau), welche bekanntlich reich an ultravioletten Strahlen, ähnlich dem natürlichen Bergsonnenlicht.

Vor allem machte ich folgenden Versuch, um eine Vorstellung zu bekommen über die Penetrabilität der Glaswand des Probierglases für aktinische Strahlen. In 2 Probiergläser, von denen das eine ganz trocken war und das andere etwas feuchte innere Wände hatte, wurden 2 Blätter Chlorsilberpapier gelegt (aus Kellers Erythemdosimeter), worauf die Probiergläser zugepfropft wurden. Neben die Gläser wurde

1) Saat auf Wassermann-Nahrungssubstanz.
2) Saat auf Hottinger-Nahrungssubstanz.

ein eben solches Blatt Chlorsilberpapier gelegt. Nachher wurde die Bach-Lampe angezündet, wobei der Brenner 0,5 m von der Oberfläche entfernt war, auf welcher die Chlorsilberpapiere lagen. Das Resultat erwies, daß das unmittelbar bestrahlte Papier die Farbe vom Erythemdosimeter-Indikator nach 45 Sek. erhielt, das im feuchten Probierglas liegende Papier nach 150 Sek. und schließlich das im trockenen Probierglas liegende Papier nach 350 Sek. Auf solche Weise hatten die aktinischen Strahlen, welche durch die Glaswand des Probierglases filtriert waren, im feuchten Milieu 33,0 Proz. ihres ursprünglichen chemischen Einflusses und im trockenen nur 12,8 Proz. Die Aktivität der chemischen Strahlen in unseren Probiergläsern mit ihrer gallertigen Wassermannschen Nährsubstanz und dem Bodensatz des Kondensationswassers, ist etwa gleich $^1/_3$ der chemischen Aktivität, welche die Strahlen hätten, wenn dieselben nicht durch das Probierglas filtriert wären unter normalen Bedingungen ihres atmosphärischen Milieus wirken würden.

Die Bestrahlung der Tuberkelkulturen wurde vorgenommen bei einem Abstand des Brenners von der Saat von 0,5 m (in 1 Versuch) und 0,25 m (in 2 Versuchen). Die Dosis wurde jedesmal nach Kellers Erythemdosimeter festgestellt. Um die Dosis 1 HSE bei einem Abstand von 0,25 m zu bekommen, brauchte man 32 Sek. Für jede Dosis benutzte ich 3 Probiergläser, neben die ein Thermometer gelegt wurde. Die Vergleichung wurde mit Kontrollprobiergläsern vorgenommen, welche in allen Fällen einen üppigen Wuchs ergaben, der gleich 100 Proz. angenommen wurde.

Die Resultate der Versuche sind zu ersehen aus Tabelle III:

Tabelle III.

Dosis	Temperatur zum Schluß der Bestrahlung nach C	Wuchs der Tuberkelbazillen in Probiergläsern	
		mit bestrahlter Saat	mit bestrahlter Nahrungssubst.
5 HSE.	22°	100 Proz.	100 Proz.
10 „	22°	100 „	100 „
15 „	23°	100 „	100 „
20 „	24°	100 „	100 „
30 „	29°	75 „	—
40 „	31°	75 „	—
60 „	28°	40 „	100 Proz.
90 „	32°	30 „	—
120 „	38°	10 „	80 Proz.
120 „	36°	Steril	80 „
150 „	38°	„	80 „
150 „	38°	„	80 „

Die Tabelle ergibt, daß 1) abgesehen von dem beträchtlichen Hindernis, welches die Glaswände der Probiergläser den chemischen Strahlen der Bach-Lampe entgegenstellten, die Strahlenenergie derselben einen energischen sterilisierenden Einfluß auf die Tuberkelbazillen in vitro hat und 2) ein kleiner Teil dieser sterilisierenden Wirkung beruht scheinbar auf dem indirekten Einfluß der Strahlen, und zwar auf die durch ihn hervorgerufenen chemischen Veränderungen der Nährsubstanz.

6) Einfluß der X-Strahlen auf das Wachstum der Tuberkelbazillen in vitro. Die ersten Untersuchungen dieser Art machte Pott. Nachdem er festgestellt hatte, daß die dicksten Probiergläser durchdringlich sind für X-Strahlen, unterwarf er die Tuberkelbazillen, welche auf Pepton-Glyzerin-Agar gesät waren, dem Einfluß der letzteren während $^1/_2$—11 Std. Dabei konnte er in den Kulturen keine Abweichungen von dem normalen Wuchs entdecken. Dieselben Resultate erhielten Bergonié und Ferré. Rieder, welcher die auf Fleischextrakt-Glyzerin-Pepton gezüchtete Tuberkelkultur der Wirkung der X-Strahlen während 1 Std. unterwarf, erhielt zweifelhafte Resultate. Lange und Fraenkel ließen auf die Tuberkelbouillonkultur Röntgenstrahlen wirken in Dosen von 5—10 S-N. Es wurden Bazillen vom Typus humanus et bovinus in Mischung 1:10000, von 20, 30, 40 und 43 Tage alt genommen. Nach der Bestrahlung wurden die Kulturen in Dosen von 0,1, 0,01 und 0,001 mg Meerschweinchen unter die Haut iniiziert. Die Autoren kamen beim Vergleich der Wirkung der röntgenisierten mit den Kontrollkulturen zu folgenden Resultaten: 1) X-Strahlen wirken tödlich auf die Tuberkelbazillen, wenn dieselben in genügend dünner Suspension genommen werden, 2) ältere Kulturen (von 4 Wochen und älter), lassen sich töten; jüngere Kulturen (17—20 Tage alt) aber widerstehen den Röntgenstrahlen.

In meinen Versuchen brauchte ich den Induktor „Sanitas" mit Funkendistanz 18 cm, Gasröhre „Gundelach" mit Wasserkühler, Stromkraft 2 mA; Härte 6—7 nach Wehnelt. Die Entfernung von der Kultur (resp. der Oberfläche der Nährsubstanz) von der Antikatode betrug 23 cm; F-max.; die Dosis wurde festgestellt durch Pastillen von Sabouraud und Noiré (1 S-N = 18 Min. Exposition). In allen Versuchen betrug die Temperatur 20° C. Im 1. Versuch wurden die Probiergläser nicht zugedeckt und im 2. und 3. zugedeckt mit schwarzem Papier (um die Kulturen vor Antikatodenstrahlen zu schützen). Aluminiumfilter wurde, um die weichen Strahlen auszuschalten, nicht benutzt. Für jede einzelne Dosis wurden 2—3 Probiergläser gebraucht. Der Vergleich des Wachstums wurde mit den Kontrollprobiergläsern vorgenommen, die gleich 100 Proz. waren. Die Resultate der Versuche sind folgende:

Tabelle IV.

N-Versuch	Dosis	Wuchs der röntgenisierten Tuberkelbazillen
I	1,5	100 Proz.
	2,5	100 „
II	3,0	90 „
	4,0	90 „
III	7,0	90 „
	7,0	90 „

Diese Versuche zeigen, daß die Röntgenstrahlen keinen wesentlichen Einfluß auf Tuberkelkulturen haben.

7) Einfluß der Radiumstrahlen auf das Wachstum der Tuberkelkulturen in vitro. Mehr oder weniger klar ausgeprägte bakterizide Eigenschaften besitzen, den Literaturangaben entsprechend

(Strebel, Danisch, Hoffman, Werner und Chlopin) nur β-Strahlen. Was die γ-Strahlen betrifft, so haben dieselben scheinbar keine bakteriziden Eigenschaften, was vollkommen mit den Resultaten der meisten Autoren bei Untersuchung der Röntgenstrahlen (deren physische Natur analogisch ist den γ-Strahlen des Radium) übereinstimmt.

Brülowa, die auf die Bakterien Radium einwirken ließ (welche Strahlen, ist leider nicht angegeben, scheinbar gemischte), schließt, daß die Radiumstrahlen nicht nur die morphologischen Eigenschaften der Mikroben (Entstehung besonderer Formen der Vermehrung, atavistische, degenerative Formen u. a.), sondern auch die antigenen Eigenschaften verändern können.

Für meine Versuche verwandte ich Platinkapseln, die Bromsalz-Radium enthielten, in folgenden Dosen: 5,12 mg, 5,32 mg, 9,92 mg, 9,93 mg, 18,99 mg, 10,20 mg. Die Platinkapseln ließen α-Strahlen gar nicht durchdringen, β-Strahlen teilweise, und γ-Strahlen ganz. Um nur γ-Strahlen zu bekommen, wurde die Platinkapsel in eine Silberhülle eingeschraubt, welche die β-Strahlen völlig zurückhielt.

Der Versuch wurde in folgender Weise vorgenommen: Je 4 Probiergläser wurden zusammengebunden und die Radiumkapsel dazwischen gelegt; die Oberfläche der Tuberkelkultur resp. Nährsubstanz wurde dem Zentrum zugewandt, wo die Kapsel lag. Die Exposition wurde bei Stubentemperatur (17—20° C) vorgenommen. Zum Vergleich wurden Kontrollprobiergläser benutzt, in welchen das Wachstum gleich 100 Proz. angenommen wurde. In dieser Weise wurden 3 Versuche gemacht, deren Resultate Tabelle V zeigt:

Tabelle V.

Art der Strahlen	Milligramm-Stunden-Bestrahlung	Wachstum der Tuberkelbazillen in Probiergläsern	
		mit bestrahlter Saat	mit bestrahlter Nährsubstanz
γ-Strahlen	9,31	120 Proz.	100 Proz.
„	98,42	100 „	100 „
„	198,57	100 „	100 „
β u. γ-Strahlen	5,32	100 „	100 „
Dgl.	30,07	100 „	100 „
„	102,40	100 „	90 „
„	108,37	100 „	100 „
„	198,40	100 „	100 „
„	198,90	100 „	100 „
„	392,79	80 „	100 „
„	400,05	100 „	100 „
„	2140,85	80 „	100 „
„	4146,40	100 „	100 „

Obige Ergebnisse zeigen, daß die β- und γ-Strahlen in bezug auf Tuberkelbazillen in vitro keine einigermaßen wesentlichen bakteriziden Eigenschaften besitzen. (Einzelne Abweichungen im Wuchs der Tuberkelbazillen nach + oder — liegen offenbar in technischen Fehlern des Versuches).

8) Schluß. Unsere experimentellen Untersuchungen zeigen demnach, daß von allen obigen Arten der Strahlenenergie die stärkste bakterizide Wirkung die Sonnenstrahlen auf die Tuberkelbazillen in

vitro haben, mit welchen das künstliche Licht der Bogen- und Quecksilber-Quarzlampe erfolgreich konkurriert. Weißes Licht wirkt am stärksten, zweifellos haben aber auch die einzelnen Teile des Lichtes sterilisierenden Einfluß auf die Tuberkelbazillen, so die rechte Hälfte des Spektrums, wie auch die linke. Von farbigen Strahlen haben die grünen ($\lambda = 595 - 555$), resp. der mittlere Teil des sichtbaren Spektrums, die stärkste hemmende Wirkung auf das Wachstum der Tuberkelbazillen. Der bakterizide Effekt hängt hauptsächlich von der geraden Wirkung der Strahlenenergie auf die Bazillen ab und ebenso, wenn auch in geringerer Weise, scheinbar von den photochemischen Veränderungen der Nährsubstanz. Die Röntgenstrahlen, ebenso β- und γ-Strahlen des Radiums aber haben keine wesentliche Wirkung auf die Tuberkelbazillen in vitro.

Literatur.

Beck u. Schultz, Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 23. 1896. — Bergonié et Feré. Soc. d'anat. et de physiol. Bordeaux. Juillet 1897. — Brülowa, Thesen und Autoreferate d. III. Antituberkulose-Kongresses. U.S.S.R. Charkow. 1924. — Chlopin, Grundlagen d. Hygiene. Moskau u. Petersburg. 1923. Bd. 2. — Chmelewsky, Wratsch (Arzt). 1892. Nr. 20. — Ders., Zur Frage d. Wirkung d. Sonnen- und elektrischen Lichtes auf Eiter-Mikroben. (Dissert.) Petersburg. 1893. — Di-Donna, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 42. 1906. S. 642. — Heissler, Wratsch. 1891. Nr. 36. — Jessionek, Strahlentherapie. Bd. 7. H. 1. — Koch, Vortrag auf d. X. internat. Kongreß. Berlin. 1890. — Kotljar Wratsch. 1892. Nr. 39—40. — Lange u. Fraenkel, Klin. Woch. 1923. S. 1161. — Mesernitzky, Physiotherapie. T. 1. Petrograd. 1916. — Mink, Münch. med. Woch. 1906. S. 1906. — Nemenow, Roussky wratsch. 1916. — Ders., Röntgenotherapie. Petrograd. 1920. — Pansini, Rivista d. Ig. 1889; nach Pilnow u. Mesernitzky. — Pilnow, Zur Frage d. Behandl. d. Lupus vulg. Kasan. 1904. Pott, Lancet. 1897. Vol. II. p. 1314. — Rieder, Münch. med. Woch. 1898. S. 101 u. 773. — Roux, Annal. de l'Inst. Pasteur. 1887. T. 1. p. 445. — Russ. Arch. f. Hyg. Bd. 56. 1906. S. 341. — Santori, Bullet. d. Accad. med. di Roma, 1889—90. — Scholz, Deutsch. med. Woch. 1903. Nr. 33—34. — Steriopulo, Wegen der Tuberkelbazillen. Moskau. 1908. S. 158—160. — Strauss, La tuberculeuse et son bacille. Paris. 1895; nach Treskinskaja. — Tomaschewsky, Wirkung d. Strahlenenergie auf d. Bakterien. (Diss.) Petersburg. 1901 u. Roussky Chirurgitschesky Arch. 1902. — Treskinskaja, Zur Frage über d. Wirkung des Sonnenlichtes auf d. Tuberkelbazillen. Petersburg. 1910. — Weinzirl, Sixth Internat. Congreß on Tuberculosis. Washington. 1908. — Zeit, Journ. Americ. medic. assoc. 1901.

Nachdruck verboten.

Beitrag zur Aktinomycesfrage.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Geh. Hofrat Prof. Dr. H. Kossel).]

Von Prof. Dr. med. et phil. **E. G. Dresel.**

Seit dem Erscheinen des Buches von Lieske (1): „Morphologie und Biologie der Strahlenpilze" scheint die Frage nach dem Erreger des unter dem Namen Aktinomykose gehenden klinischen Krankheitsbildes für manche Forscher geklärt zu sein. Wenigstens treten Heim und Kolle-Hetsch in ihren Lehrbüchern Lieske bei. Auch Rullmanns (2) schon früher vertretener Standpunkt scheint durch Lieske gesichert zu sein.

Im folgenden soll gezeigt werden, daß trotz des Lieskeschen Buches die Frage noch nicht geklärt ist.

In meiner Arbeit zur Kenntnis der Aktinomykose (3) konnte ich mitteilen, daß ich in 7 Fällen von Erkrankungen des Menschen mikroskopisch und kulturell den anaëroben Actinomyces Wolff-Israel, in 2 Fällen eine Mischinfektion des anaëroben Actinomyces Wolff-Israel mit einem anaëroben Pilz (Streptothrix) nachweisen konnte. Außerdem gelang mir 3mal aus aktinomykotischen Prozessen von Rindern die Reinzüchtung des anaëroben Actinomyces Wolff-Israel.

Die Schlußsätze meiner Arbeit lauteten:

1) Die Aktinomykose des Menschen und des Rindes beruht auf Infektion mit einem anaëroben Trichomyceten (Actinomyces Wolff-Israel). — 2) In manchen Fällen besteht eine Mischinfektion mit einer aëroben Streptothrix-Art (Actinomyces-Gruppe Boström). 3) Außer der echten Aktinomykose gibt es klinisch der Aktinomykose ähnlich verlaufende Erkrankungen, bei denen im sezernierten Eiter ausschließlich aërobe Streptotricheen gefunden werden. In diesen Fällen können drusenähnliche, makroskopisch sichtbare Klümpchen vorkommen, die aus Knäueln verfilzter Streptothrix-Fäden bestehen. — 4) Andererseits können in frischen Fällen von echter Aktinomykose, besonders bei frühzeitiger eitriger Einschmelzung des Gewebes, Drusen im sezernierten Eiter völlig fehlen. — 5) Die Frage, ob es sich in einem gegebenen Falle um echte Aktinomykose oder um Streptotrichose oder um eine Mischinfektion von Aktinomykose und Streptotrichose handelt, kann nur durch die anaërobe und aërobe Züchtung entschieden werden.

Diesen Standpunkt lehnt Lieske ab und schreibt: „daß nicht nur die einzelnen kultivierten, sowohl aëroben als auch anaëroben Stämme sehr wesentliche Abweichungen voneinander aufweisen, sondern daß sich auch von den aëroben zu den anaëroben Formen alle möglichen Uebergänge feststellen lassen“ (S. 225). Da mich Lieske (S. 227) als sehr eifrigen Verfechter der Verschiedenheit der aëroben und anaëroben Strahlenpilzformen zitiert, nehme ich Veranlassung, auf diese Streitfrage zurückzukommen. Grund für mich ist die Tatsache, daß es in dem von mir geleiteten Untersuchungsamte für Infektionskrankheiten am Hygienischen Institut in Heidelberg in den Jahren seit Abschluß meiner Arbeit zur Kenntnis der Aktinomykose, also von 1914 bis einschließlich 1924, gelang, den anaëroben Strahlenpilz mikroskopisch und kulturell in 51 Fällen nachzuweisen. Das Material entstammte vorwiegend den Heidelberger Kliniken. In keinem Falle gelang es, den Pilz durch aërobe Kulturen zu isolieren, ebensowenig gelang es, die anaërobe Reinkultur auf aëroben Nährböden fortzuzüchten. Schon in meiner ersten Veröffentlichung wies ich darauf hin, daß das Sauerstoffbedürfnis des Pilzes ein eigenartiges ist, nämlich, in Uebereinstimmung mit der Beobachtung von Wolff-Israel, eine gewisse Sauerstoffspannung verträgt. Ich teilte auch damals schon mit, daß sich auf aëroben Schrägagarkulturen gelegentlich im Kondenswasser einzelne spärliche Kolonien zeigten; doch hatten diese Kolonien niemals Lufthyphen, gewöhnten sich auch nicht an den Sauerstoff und ließen sich nicht fortzüchten. Nur in einem Falle von unseren anaëroben Actinomyces-Pilzen bekamen wir ein schwaches aërobes Wachstum, doch wuchs in diesem Falle der Pilz aërob nur in engstem Zusammenleben mit einem feinen gramnegativen Stäbchen. Besonders beachtenswert ist vielleicht der Hinweis, daß diese morphologisch und kulturell gleichartigen Befunde im Laufe der 11 Jahre von 12 verschiedenen, im Untersuchungsamt beschäftigten

Assistenten und Laborantinnen erhoben sind und, mit Ausnahme von Oktober 1918 bis Februar 1919, von mir kontrolliert wurden.

Interessant ist es daher, einmal die Aeußerungen Lieskes über das Sauerstoffbedürfnis seiner pathogenen Strahlenpilze zusammenzustellen. Er hält die Trennung in aërobe und anaërobe überhaupt nicht für durchführbar. Lieske schreibt: „Es gibt pathogene Strahlenpilzformen, die bei vollem Sauerstoffdruck überhaupt nicht wachsen (z. B. Stamm Levy). Die von mir kultivierten Stämme Kö. und Ro. konnten ebenfalls auf keine Weise aërob zum Wachstum gebracht werden, ebenso anfangs der Stamm Si. Häufiger sind Stämme, die anaërob besser wachsen, die aber auch bei vollem Sauerstoffdruck ein allerdings nur kümmerliches Wachstum zeigen." Dazu rechnet Lieske die Stämme von Wolff-Israel (4), von Harbitz und Gröndahl (5), Ziegler (6), Aschoff (7) und Urban (8). Diese Stämme stimmen durchaus mit dem Wolff-Israelschen überein. Lieske schreibt weiter, daß die meisten von ihm kultivierten Stämme vom Typus Wolff-Israel sich ebenfalls mehr oder weniger gut aërob kultivieren ließen. Leider geht aus Lieskes Mitteilungen nicht hervor, was er unter mehr oder weniger gut aërob versteht. S. 227 heißt es: „Der von mir kultivierte menschenpathogene, anfangs rein anaërobe Stamm Si. bildete später bei aërobem Wachstum keine wesentlich längeren Fäden". S. 230 heißt es dann: „Im allgemeinen verändern sich die anaëroben Stämme in Kulturen allerdings sehr wenig. Der von mir isolierte anaërobe Stamm Si. wurde über 3 Jahre lang in Bouillonröhrchen kultiviert und veränderte sich in dieser Zeit nur dadurch, daß er später etwas mehr Sauerstoff vertrug als anfangs; in die typische aërobe Form ging er aber nicht über."

Als Kronzeugen für die Umwandlung von anaëroben in aërobe Stämme werden Bujwid (9) und Mertens (10) von Lieske zitiert. Bujwid schreibt: „Das Wichtigste an der Tatsache (der Reinkultur) ist, daß Actinomyces, wie aus der Methode der Kultur folgt, ein fakultativ anaërobischer Pilz ist." Später zum Schluß seines Aufsatzes, schreibt er dann über die Methode der Reinzüchtung: „Wenn man aber reine isolierte Klümpchen nimmt oder in der Tiefe der Agarschicht liegende Zäpfchen abschneidet, kann man ganz reine Kulturen bekommen und die weiteren Generationen selbst bei Luftzutritt rein züchten." Dieser Satz ist in seiner Fassung so dunkel, daß seine Beweiskraft wesentlich leidet. Auch der Fall von Mertens ist nicht beweiskräftig. Wright (11) nimmt an, daß Mertens mit einem unreinen Stamm gearbeitet hat. Mertens hatte wohl sicher anfangs einen anaëroben Pilz. Er schreibt gesperrt: „Alle zahlreichen Versuche durch Zerdrücken von Körnchen und Verreiben des Detritus auf der Agarfläche blieben ausnahmslos erfolglos: Es gelang nicht, eine Oberflächenkultur zu erzielen."

Nur aus Bouillonkulturen in der 4. Generation, in der von 5 Röhrchen nur 1 anging, erhielt er plötzlich einen aëroben Pilz. Dieser Befund spricht mir eher für eine Verunreinigung durch einen Saprophyten als für eine Umwandlung des anaëroben in einen aëroben Pilz.

Mit diesen von mir abzulehnenden beiden Zeugen kann Lieske also seine Umwandlungsauffassung sicher nicht einwandfrei stützen. Wie ich den Boströmschen (12) Fall auffasse, habe ich früher eingehend berichtet. Ich meine, daß Boström genau wie Pinoy (13) und ich

Mischinfektionen vom anaëroben und aëroben Pilz vor sich gehabt hat, daß es ihm aber nur gelang, den aëroben Pilz reinzuzüchten.

Immerhin ist es auch auffallend, daß bei der riesigen Literatur, die über die Actinomyces-Frage entstanden ist, nur diese 3 Autoren die Umzüchtung des anaëroben in den aëroben Pilz fertig gebracht haben sollten, und das auch nur in je einem Falle.

Wenn Lieske weiterhin meint, daß morphologisch zwischen dem anaëroben und aëroben Pilz keine Unterschiede beständen, so kann ich nur auf die eingehenden Ausführungen in meiner früheren Arbeit verweisen. (Man vergleiche dort besonders Taf. II, Abb. 1, 3 und 6). Im Gegensatz zu dem aëroben Pilz (Streptothrix Boström) handelt es sich bei dem anaëroben Pilz um das Auswachsen von Kurzstäbchen und nicht, wie bei dem aëroben, um das Auswachsen von sporenähnlichen, kokkenartigen Gebilden. Zwar haben die ausgewachsenen Fäden beider Pilze eine gewisse Aehnlichkeit, doch wächst der anaërobe Pilz kurzwelliger, knorriger als der langwellige, weich gewundene aërobe. Wesentlich aber ist der Unterschied, daß der Pilz von Boström im Tierkörper und in der Kultur Fäden bildet, die Schläuche darstellen. Diese Schläuche enthalten Sporen, die Neukirch (14) im Gegensatz zu den echten Sporen der Bakterien Oidiensporen genannt hat. Diese Sporen können wieder zu Fäden auswachsen. Außerdem bildet der anaërobe Pilz, eben weil er anaërob ist, niemals Lufthyphen. Ich vermisse in Lieskes Abhandlung den Beweis dafür, daß der anaërobe Pilz Schläuche mit Sporen bildet und daß bei der Ueberführung des anaëroben in die aërobe Wuchsform nun auch die Lufthyphen auftreten. Auf den Unterschied im Längenwachstum der anaëroben und aëroben Pilze habe ich keinen besonderen Wert gelegt, auch darauf hingewiesen, daß ich aus Kulturen auf rohen Eiern den anaëroben Pilz in langen Fäden gewinnen konnte[1]).

Einer kurzen Besprechung bedarf noch die Frage der Drusen. Lieske schreibt: „Bei Fällen klinisch typischer Aktinomykose des Menschen lassen sich folgende Möglichkeiten beobachten:

1) Der Eiter enthält echte Drusen mit Kolben, Kulturen anaërob, kurzfädig. — 2) Der Eiter enthält keine Drusen, sondern lange Fäden ohne Kolben, die Fäden können zu drusenähnlichen Knäueln zusammengeballt sein. Kulturen kurzfädig, anaërob. — 3) Befund wie 2), aber Kulturen aërob, langfädig. — 4) Der Eiter enthält echte Drusen mit Kolben, es lassen sich aus demselben sowohl kurzfädige anaërobe, als auch langfädige aërobe Kulturen gewinnen."

Sicher ist Nr. 1—3 zuzustimmen. Vgl. meine oben zitierten früheren Schlußsätze. Auch Satz 4 von Lieske ist in der Fassung einwandfrei. Doch kann ich den daraus abgeleiteten Schlußfolgerungen Lieskes nicht zustimmen. Wenn er schreibt: „Von kolbentragenden Drusen wurden sowohl aërobe als auch anaërobe Kulturen gewonnen, ebenso

---

1) Lieske zitiert mich falsch bei der Besprechung des morphologischen Bildes der Fäden. Er schreibt S. 227: Dresel sagt selbst: Mikroskopisch erwiesen sich die Kolonien (der anaëroben Strahlenpilze)*) immer als dichte Haufen wirrliegender kurzer Stäbchen und kurzverzweigter Fäden. Lang ausgewachsene Fäden wie im Ausgangsmaterial zeigten sich nie." Lieske hat leider übersehen, daß mein oben zitierter Satz anfängt: Mikroskopisch erwiesen sich diese Kolonien ..... Das Wörtchen „diese" bezieht sich auf die Besprechung der Kulturen in Agar in hoher Schicht. Bei der Besprechung meiner Kulturen auf rohen Eiern habe ich darauf hingewiesen, daß hier die Pilze zu langen Fäden auswachsen.

*) Klammer von Lieske.

wie von kolbenfreien. Als Unterscheidungsmerkmal können die Kolben jedenfalls nicht dienen", so ist dazu zu bemerken: Ich habe in der Literatur keinen Fall gefunden, daß aus kolbenfreien Knäueln, denn von Drusen sollte man hier nicht sprechen, der anaërobe und aërobe Pilz gezüchtet ist. Lieske selbst teilt S. 201/3 seines Buches mit, daß er in den 9 seiner Fälle, in denen er den anaëroben Pilz reinzüchtete, jedesmal Drusen hatte, dagegen in seinen aëroben Fällen niemals Drusen. Weiterhin heißt es bei Lieske: „Interessant ist noch, daß zuweilen aus demselben Ausgangsmaterial sowohl aërobe als auch anaërobe Kulturen gewonnen wurden. Die Erklärung, daß es sich hierbei um eine Mischinfektion zweier verschiedener Organismen handelte, ist recht unwahrscheinlich, es ist viel naheliegender, anzunehmen, daß verschiedene Entwicklungsstufen des Erregers, auf die üblichen künstlichen Nährböden gebracht, je nach dem Grade der Entwicklung aërob bzw. anaërob weiterwachsen." Boström hat nur den aëroben Pilz reingezüchtet. Bujwids dunkler Satz läßt keine bündige Schlußfolgerung zu; sicher ist, daß er nicht sofort aus dem Ausgangsmaterial beide Formen erhielt, ebensowenig wie Mertens. Also bleiben in der Literatur nur der eine Fall von Pinoy und meine beiden Fälle, in denen die Trennung des anaëroben und aëroben Pilzes aus dem Ausgangsmaterial gelang.

Ich möchte daraus den Schluß ziehen, daß das klinische Bild der Aktinomykose des Menschen in erster Linie durch den anaëroben Actinomyces Wolff-Israel verursacht ist, der allein imstande ist, unter bestimmten Gewebsverhältnissen die charakteristischen Drusen mit Kolben zu bilden.

Aërobe Pilzfäden (Streptotricheen) können ähnliche Krankheitsbilder hervorrufen, doch kommen dabei niemals echte Drusen vor, sondern höchstens Pilzknäuel, die makroskopisch Drusen vortäuschen können. Diese Feststellung ist deshalb wichtig, weil der Name Actinomyces ganz ausschließlich gerade von den typischen Drusen abgeleitet von Harz (15) geprägt ist.

Wenn nun die Bezeichnung der morphologisch und biologisch sich anders verhaltenden aëroben Pilze als Streptothrix) abgelehnt wird, weil er von Corda für einen ganz anderen Pilz bereits vergeben war, dann muß man logischerweise auch den Namen Actinomyces, eben weil er für den Pilz, der allein imstande ist, typische Drusen mit Kolben in strahlenförmiger Anordnung zu bilden, von Harz vergeben ist, für jene Pilze ablehnen, die nicht imstande sind, Drusen zu bilden. Sicher ist, daß der anaërobe Pilz mit geringen Abweichungen scharf charakterisiert ist und an den verschiedensten Fundorten auf der Erde, in Norwegen, Nord- und Südamerika, in Japan und Deutschland durchaus übereinstimmt, während die aëroben Pilze, meist als Saprophyten gerade nach den Beschreibungen von Lieske recht große Abweichungen voneinander zeigen und eine große Familie zu bilden scheinen. Wenn Lieske schreibt, S. 230: „Bei den anaëroben Formen treten diese Unterschiede weniger hervor als bei den aëroben, was mit der wesentlich geringeren Wachstumsintensität dieser Formen zusammenhängt. Es ist aber sicher, daß es ebenso schwer gelingen wird, von verschiedenen Krankheitsfällen zwei völlig gleiche pathogene Strahlenpilzstämme zu kultivieren, als aus der Natur von verschiedenen Standorten zwei vollkommen gleiche saprophytische Formen zu finden", so kann ich nur auf meine 63 Fälle von 60 verschiedenen erkrankten Menschen und 3 Rindern hinweisen, die völlig gleiche pathogene anaërobe Strahlen-

pilzstämme ergaben und höchstens so geringe Abweichungen im Wachstum aufzeigen, wie alle unsere bekannten pathogenen Mikroorganismen in ihren einzelnen Reinkulturen.

Ich schlage also vor, den Namen Aktinomykose nur für jene Krankheiten zu verwenden, die von dem streng charakterisierten anaëroben Pilz vom Typus Wolff-Israel, für den Harz den Namen Actinomyces prägte, hervorgerufen werden. Will man für die übrigen aëroben, meist saprophytischen, gelegentlich auch pathogenen, recht verschiedenartigen Fadenpilze den Namen Streptothrix nicht verwenden, dann mögen die Botaniker für diese Gruppe einen zweckentsprechenden Namen vorschlagen. Der Name Actinomyces ist zur Gruppenbezeichnung durchaus ungeeignet und kommt nur dem anaëroben Pilz zu, der imstande ist, Drusen zu bilden.

Literatur.

1) Lieske, R., Morphologie und Biologie der Strahlenpilze. Leipzig (Gebr. Borntträger) 1921. — 2) Rullmann, Münch. med. Woch. 1914. S. 1899; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 79. S. 383. — 3) Dresel, E. G., Beiträge z. patholog. Anat. u. z. allg. Path. Bd. 60. 1914. — 4) Wolff-Israel, Virchows Arch. Bd. 126. 1891. S. 11; Arch. f. Hyg. Bd. 151. 1898. S. 471. — 5) Harbitz u. Gröndahl, Zieglers Beitr. Bd. 50. 1911. S. 193. — 6) Ziegler, Münch. med. Woch. 1895. S. 373. — 7) Aschoff, Berl. klin. Woch. 1895. S. 786. — 8) Urban, Münch. med. Woch. 1897. S. 124. — 9) Bujwid, Centralbl. f. Bakt. Bd. 6. 1889. S. 630. — 10) Mertens, Ztschr. f. Hyg. Bd. 42. 1903. S. 45. — 11) Wright, Publicat. Massachus. General Hospital. Nr. 1. 1905. — 12) Boström, Zieglers Beitr. Bd. 9. 1890. — 13) Pinoy, Bull. Instit. Pasteur. 1913. Nr. 21/22. — 14) Neukirch, Diss. Straßburg. 1902. — 15) Harz, Jahresber. d. Tierarzneischule München. 1877/78. S. 125.

Nachdruck verboten.

Ueber Normalagglutinine für Ruhr- und andere Bazillen.

[Aus dem Hygienischen Institute zu Leipzig (Direktor: Prof. Kruse).]

Von Dr. **Richard Burgdorf.**

Mit 2 Kurven im Text.

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bildeten die Ergebnisse der neueren Arbeiten über die Isohämagglutinine des menschlichen Blutes, die gewisse biologische Zusammenhänge zwischen Rasse und Blutzusammensetzung gezeigt hatten. Es ist ja sicher, daß Rassenunterschiede sich nicht nur in groben anatomischen Merkmalen auszuprägen brauchen, sondern auch in den feineren biochemischen Vorgängen der Zellen und Säfte des Organismus. Auch die übrigen Antikörper des menschlichen Blutes wären nach dieser Richtung hin zu untersuchen.

Bekannt sind ja schon seit langem die beträchtlichen individuellen Unterschiede in der Wirkung der normalen Agglutinine des Menschen z. B. für Ruhrbazillen. Besonders hatten uns auch die Untersuchungsreihen Müllers gezeigt, in welch weiten Grenzen die agglutinierende Wirkung auf ein und dieselbe Bakterienart bei der gleichen Tierart sich bewegt.

Es war denkbar, daß sich durch systematische Untersuchung einer großen Reihe von Blutseren Gesetzmäßigkeiten in den Schwankungen des Agglutinationstiters derselben Bakterienart feststellen ließen, daß sich vielleicht auch hier eine Gruppenbildung nachweisen ließ, die möglicherweise im Zusammenhang stand mit der Gruppenbildung der Isohämagglutinine.

Technik der Versuche:

Es wurde von einer 24stündigen Agarkultur in physiologischer Kochsalzlösung eine Bakterienaufschwemmung hergestellt. Von dieser Aufschwemmung wurde eine Platinöse genommen und mit einer Oese des Serums bzw. der entsprechenden Serumverdünnung vermischt. Untersucht wurde im hängenden Tropfen mit Oelimmersion, und zwar nach einer Stunde und nach 24 Stunden, nachdem die Präparate während dieser Zeit bei Zimmertemperatur gelegen hatten.

Um die Grenzworte der Agglutination festzustellen, wurde die 5-, 10-, 25-, 50-, 100-, 200-, 400fache Verdünnung hergestellt, eventuell wurde die Verdünnung noch weiter getrieben.

Als Grenzwert der Agglutination habe ich immer die Verdünnung angenommen, bei der sich noch deutliche, wenn auch geringe Klümpchenbildung nachweisen ließ.

Kontrollpräparate wurden immer angelegt.

Zuerst wurden auf diese Weise 5 Kaninchen-, 5 Hammel- und 5 Meerschweinchensera untersucht. Als Bakterienstämme wurden vor allem die Bazillen der Ruhr (Kruse), der Pseudodysenterie D, A und H, die der Institutsammlung entnommen wurden, verwandt. Die individuellen Unterschiede waren bereits bei dieser kleinen Anzahl untersuchter Sera ziemlich beträchtliche. Sie schwankten beispielsweise bei Kaninchenserum für echte Ruhr von 1:0—1:10, für Pseudodysenterie A und D von 1:10—1:100, für Pseudodysenterie H von 1:0—1:25.

Es agglutinierten Pseudodysenterie A und D am stärksten. Sie ververhielten sich ungefähr gleich, während Pseudodysenterie H bedeutend schwächer agglutinierte. Noch schwächer als H agglutinierte echte Ruhr.

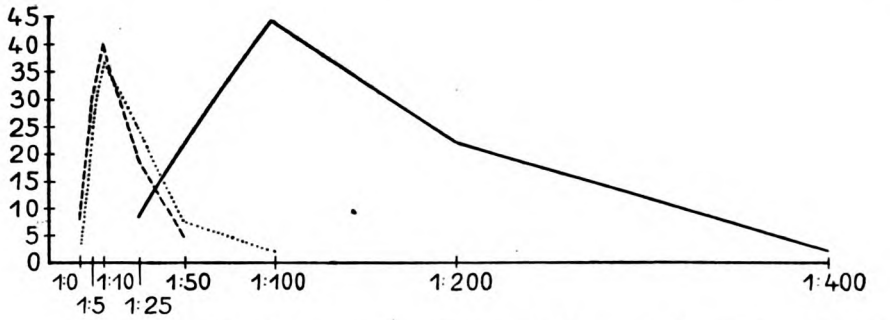
Wichtiger waren für unseren Zweck die Versuche mit menschlichem Serum, das in den zur Wassermannschen Reaktion eingesandten Blutproben reichlich zur Verfügung stand. Verwandt wurde ausschließlich inaktiviertes Serum.

Im ganzen wurden 200 Blutseren gegenüber den gleichen Bakterienstämmen untersucht; nur wurde zur Vereinfachung Pseudodysenterie A bald ausgeschaltet. Sein Verhalten war ungefähr das gleiche wie das von Pseudodysenterie D. Da die Aufführung der Originaltabellen zu viel Raum in Anspruch nehmen würde, habe ich die Ergebnisse der Versuche zusammengezogen und in Tabelle I und II aufgezeichnet.

Tabelle I.

	Pseudodysenterie D	Pseudodysenterie H	Dysenterie (Kruse)
Von den 200 Seren agglutinierten bis 1:0	—	2,5 Proz.	6,0 Proz.
„ „ „ „ „ „ 1:5	—	27,5 „	29,5 „
„ „ „ „ „ „ 1:10	—	37,5 „	42,0 „
„ „ „ „ „ „ 1:25	7,0 Proz.	24,5 „	18,5 „
„ „ „ „ „ „ 1:30	23,5 „	5,5 „	4,0 „
„ „ „ „ „ „ 1:100	45,0 „	2,5 „	—
„ „ „ „ „ „ 1:200	22,5 „	—	—
„ „ „ „ „ „ 1:400	2,0 „	—	—
Durchschnittliche Agglutinationsstärke mit wahrscheinlichen Fehlern[1])	111,5 ± 3,2	16,5 ± 0,71	12,65 ± 0,45
(Stetige Abweichung)[1])	67	9,45	14,6
(Variabilitätskoeffizient)[1])	60 Proz.	75 Proz.	88 Proz.

1) Die wahrscheinlichen Fehler, stetigen Abweichungen und Variabilitätskoeffizienten wurden freundlichst von Herrn Prof. Kruse berechnet.



—— Pseudodysenterie D, ····· Pseudodysenterie H, - - - - - Dysenterie (Kruse).
Tabelle II.

Tabelle II ist die graphische Darstellung der Tabelle I. Auf der Abszisse sind die Serumverdünnungen aufgetragen, während die Ordinate die Prozentzahlen der Tabelle I angibt.

Es zeigte sich also, daß die individuellen Schwankungen sehr beträchtlich waren, sich z. B. für Pseudodysenterie D in den Serumverdünnungen 1:25—1:400 bewegten. Weiter ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den Tierseren: daß, während Pseudodysenterie D im Durchschnitt bis zur 100fachen Verdünnung agglutinierte (Pseudodysenterie A verhielt sich, wie an 16 Seren festgestellt wurde, etwa wie Pseudodysenterie D), Pseudodysenterie H bedeutend schwächer agglutinierte, nämlich höchstens bis zur 100fachen, im Durchschnitt aber nur bis zur 10fachen Serumverdünnung. Echte Ruhr verhielt sich nicht viel anders wie Pseudodysenterie H. Es war zunächst denkbar, daß der zu den Versuchen verwendete H-Stamm ein besonders schwach agglutinierender Stamm war; doch es verhielten sich sämtliche anderen 4 H-Stämme, die zur Kontrolle versucht wurden, ähnlich. Das gleiche gilt auch von den zur Kontrolle herangezogenen 5 D- und Dysenterie-Stämmen.

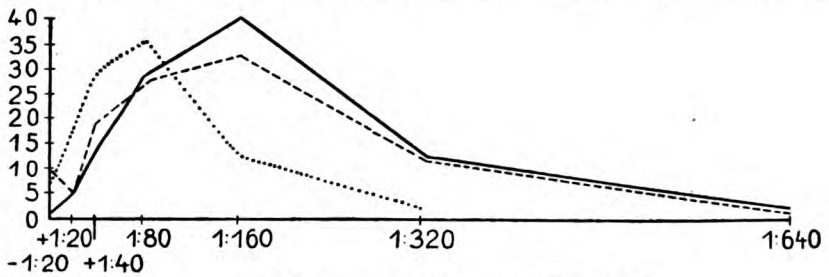
Für die individuellen Schwankungen bestehen offenbare Gesetzmäßigkeiten. Die 3 Kurven tragen den Charakter von Variationskurven mit steil ansteigenden und flach abfallenden Schenkeln. Die Kurve für Pseudodysenterie D unterscheidet sich von den beiden anderen nur dadurch, daß ihr Scheitel weiter hinausgerückt ist.

Tabelle III.

	Pseudodysenterie Y 1800	Pseudodysenterie Y rag	Flexner
Von 100 Seren agglutinierten bis — 1:20	7	1	9
„ „ „ „ „ + 1:20	17	4	4
„ „ „ „ „ + 1:40	28	14	17
„ „ „ „ „ + 1:80	34	27	26
„ „ „ „ „ + 1:160	12	40	32
„ „ „ „ „ + 1:320	2	12	11
„ „ „ „ „ + 1:640	—	2	1
Durchschnittliche Agglutinationsstärke mit wahrscheinlichen Fehlern[1]	68,1 ± 3,4	136,9 ± 7,4	122,1 ± 5,0
Stetige Abweichung[1]	49,2	111	103
(Variabilitätskoeffizient)[1]	72 Proz.	81 Proz.	84 Proz.

1) Ebenfalls von Herrn Prof. Kruse berechnet.

Aus der Literatur liegen genügend zahlreiche Untersuchungen nur vor in einer inzwischen erschienenen Arbeit von Koose, die sich mit der Agglutination von Pseudoruhrbazillen durch Schwangerensera beschäftigten. Es wurden dort zum Vergleich auch 100 Normalseren untersucht. Leider hatte Koose mit der Einteilung der Pseudoruhrbazillen in Typus Flexner, Y und Strong gearbeitet, so daß von vornherein nicht klar war, zu welchen natürlichen Gruppen der Pseudoruhrbazillen die geprüften Stämme gehörten. Der Verlauf der von mir konstruierten Kurven (Tabelle IV) spricht vielleicht dafür, daß alle drei Kulturen



..... y 1800, ——— y rag., ----- Flexner.

Tabelle IV.

Kooses solche der Pseudodysenterie D sind. Durchschnittlich enthalten die Seren für die 3 Stämme die Agglutininmenge von 68, 137 und 122, im Mittel also fast genau so viel wie unsere Sera für unseren D-Stamm (111). Derartige Schwankungen sind von vornherein wahrscheinlich.

Danach scheint es, als ob die individuellen Schwankungen in der Stärke der Agglutination eine einfache Variabilitätserscheinung darstellen.

Schon hierdurch wurde es wahrscheinlich, daß irgendwelche von den zu Anfang der Arbeit erwähnten Zusammenhänge zwischen Bakterienagglutininen und Isohämagglutininen nicht bestanden.

Da im hiesigen Institut zu gleicher Zeit in einer anderen Arbeit bei ungefähr den gleichen Seren, mit denen ich gearbeitet hatte, die Zugehörigkeit zu einer der Isohämagglutiningruppen bestimmt wurde, konnten 95 Seren in der angegebenen Richtung verglichen werden. Der Vergleich bestätigte die ausgesprochene Vermutung.

Von den 95 Seren gehörten:

6	Seren	zur	Isoagglutiningruppe	I
47	„	„	„	II
6	„	„	„	III
36	„	„	„	IV

d. h. die Prozentsätze waren die gleichen, die von Sucker hier in Leipzig an tausend Blutproben für die Isohämagglutinine gefunden wurden.

Das Verhalten der einzelnen Sera jeder Gruppe zum Agglutinationstiter der drei Bakterienstämme geben die drei folgenden Tabellen (V—VII) an.

Tabelle V. Pseudodysenterie D.

	Isoagglutiningruppe			
	I	II	III	IV
1:25	1	2	—	1
1:50	2	12	—	7
1:100	1	17	4	17
1:200	1	16	2	11
1:400	1	—	—	—

Tabelle VI. Pseudodysenterie H.

	Isoagglutiningruppe			
	I	II	III	IV
1:0	—	1	—	—
1:5	—	14	—	10
1:10	2	15	4	13
1:25	4	13	2	10
1:50	—	3	—	3
1:100	—	1	—	—

Tabelle VII. Dysenterie (Kruse).

	Isoagglutiningruppe			
	I	II	III	IV
1:0	—	4	—	2
1:5	2	11	—	13
1:10	1	21	5	9
1:25	3	10	1	10
1:50	—	1	—	2
1:100	—	—	—	—

Es zeigte sich also, daß die Dysenterie- und Pseudodysenteriebazillen in jeder der vier Isohämagglutininblutgruppen, soweit sich bei der Kleinheit der Zahlen sagen läßt, sich etwa gleich verhalten. Das gleiche hatte Koose für die von ihm geprüften Ruhrstämme feststellen können.

Des weiteren wurden noch Absättigungsversuche durchgeführt, um über die Selbständigkeit der einzelnen Agglutinine ein Urteil zu gewinnen.

Verfahren wurde nach dem Vorgange von Kruse folgendermaßen: Je $^1/_2$ ccm einer Serumverdünnung 1:5 wurde mit je einem Agarrasen einer 24std. Kultur von Dysenterie (Kruse), Pseudodysenterie D und H versetzt und 1—$1^1/_2$ Std. im Thermostaten aufbewahrt. Dann wurde bis zur Klarheit der Flüssigkeit abzentrifugiert, abgehebert und wieder die entsprechenden Verdünnungen hergestellt. Diese wurden dann von neuem auf Agglutination gegen Pseudodysenterie D, H und Dysenterie (Kruse) geprüft.

Es zeigte sich dabei, daß das Serum, das man mit Dysenterie absättigte, selbstverständlich Dysenterie nicht mehr agglutinierte, dagegen wohl noch Pseudodysenterie D und Pseudodysenterie H, und zwar in ungefähr dem gleichen Maße, als wenn das Serum nicht abgesättigt wäre.

Dasselbe traf auch bei der Absättigung mit Pseudodysenterie H zu. Dysenterie (Kruse), Pseudodysenterie D agglutinierten wie vorher, Pseudodysenterie H gar nicht.

Ganz anders fielen dagegen die Absättigungsversuche mit Pseudodysenterie D aus. In diesem Falle wurde auch zugleich Pseudodysenterie H vollständig abgesättigt; es agglutinierte nicht mehr, dagegen agglutinierte echte Ruhr wie sonst. Eine Ausnahme machte nur ein Stamm. Bei ihm trat keine Absättigung für Pseudodysenterie H ein.

Es sind also nach diesen Ergebnissen, wenn man von dem einen erwähnten Serum absieht, für Pseudodysenterie H keine Hauptagglutinine vorhanden. Vielleicht ist damit die schon früher besprochene Tatsache erklärt, daß Pseudodysenterie H im Normalserum durchgehend schwächer agglutiniert als Pseudodysenterie A und D.

Eine Nachprüfung für das bezeichnete Serum konnte ich leider nicht vornehmen, da mir durch ein Versehen das Serum verloren gegangen war.

Zum Schluß wurde noch das Verhalten einer ganzen Reihe von anderen Bakterienstämmen zu 4 besonders stark und 4 besonders schwach agglutinierenden Seren untersucht. Schon aus den 200 mit Dysenterie, Pseudodysenterie D und H untersuchten Blutseren konnte man feststellen, daß wohl lockere Zusammenhänge in der Agglutination der Bakterienstämme untereinander bestehen, indem ein irgendeinen Bakterienstamm stark agglutinierendes Serum auch die übrigen Stämme mehr oder minder stark agglutiniert. Als eine feste Gesetzmäßigkeit kann man es aber nicht hinstellen. Es bestehen doch, wie aus meinen Originaltabellen hervorgeht, eine ganze Reihe von Uebergängen, zumal die 200 untersuchten Seren nicht so ohne weiteres auf die beiden Pole „stark oder schwach" zu bringen sind.

Tabelle VIII. Vier schwach agglutinierende Seren.

	Serum 5329	Serum 5341	Serum 5359	Serum 5365
Pseudodysenterie D	1:25	1:50	1:50	1:50
Typhus	1:5	1:10	1:5	1:5
Paratyphus A	1:5	1:5	1:5	1:0
„ B	1:5	1:5	1:5	1:5
Cholera	1:5	1:25	1:10	1:25
Aerogenes	1:5	1:5	1:0	1:0
Mäusetyphus	1:0	1:0	1:5	1:10
Proteus	1:0	1:5	1:0	1:0
Vibrio Metschnikoff	1:5	1:0	1:10	1:5
Coli	1:0	1:0	1:0	1:5
Bazillus Gärtner	1:0	1:0	1:0	1:0

Tabelle IX. Vier stark agglutinierende Seren.

	Serum 5334	Serum 5343	Serum 5349	Serum 5358
Pseudodysenterie D	1:200	1:100	1:100	1:100
Typhus	1:50	1:10	1:5	1:25
Paratyphus A	1:50	1:10	1:5	1:25
„ B	1:25	1:10	1:10	1:25
Cholera	1:25	1:50	1:25	1:50
Aerogenes	1:25	1:10	1:5	1:10
Mäusetyphus	1:10	1:10	1:5	1:25
Proteus	1:10	1:5	1:5	1:25
Vibrio Metschnikoff	1:10	1:10	1:25	1:25
Coli	1:5	1:5	1:0	1:10
Bazillus Gärtner	1:5	1:5	1:0	1:5

Deutlicher treten die Zusammenhänge hervor, wenn man besonders stark und besonders schwach agglutinierende Seren gegenüberstellt, wie das in Tabelle VIII und IX geschehen ist. Im großen und ganzen agglutinierten die Pseudodysenterie D schwach bzw. stark agglutinierenden Seren auch die übrigen 12 untersuchten Bakterienstämme schwach bzw. stark. Genauere Nachprüfungen mit Absättigungsversuchen wären natürlich wünschenswert.

Zusammenfassung.

1) Die individuellen Unterschiede in der Stärke der Agglutination des menschlichen Blutserums gegenüber Ruhr- und Pseudoruhrbazillen sind als eine Variabilitätserscheinung aufzufassen. Der größte Teil der Seren zeigt im Bereich der Schwankungen des Agglutinationstiters eine mittlere Agglutinationsstärke, an die sich nach beiden Seiten mit abnehmender Häufigkeit Seren von größerer bzw. geringerer Agglutinationsstärke anschließen. — 2) Pseudodysenterie H wird durchweg schwächer agglutiniert als Pseudodysenterie A und D. Vielleicht ist das mit dem regelmäßigen Fehlen von Hauptagglutininen für Pseudodysenterie H zu erklären, wie durch Absättigungsversuche festgestellt wurde. Dysenterie (Kruse) verhält sich ähnlich wie Pseudodysenterie A und D. — 3) Die Stärke der Bakterienagglutination steht mit keiner der Isohämagglutiningruppen im Zusammenhange. In jeder dieser Blutgruppen findet sich die gleiche Variabilität. — 4) Durch diese letzten Ergebnisse ist noch nicht ausgeschlossen, daß auch die Bakterienagglutinine landschaftliche oder rassenmäßige Unterschiede aufweisen können, daß z. B. die durchschnittliche und relative Stärke der Agglutination für die einzelnen Gruppen der Ruhrbazillen an anderen Orten anders ausfallen könnte. Darüber müßten umfassende Untersuchungen entscheiden, die aber, um einen sicheren Vergleich zu ermöglichen, mit den von uns benutzten Bakterienstämmen anzustellen wären.

Literatur.

1) Kruse, Rasse und Blutzusammensetzung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. H. 1/4.) — 2) Kruse, Rittershaus, Kemp u. Metz, Dysenterie und Pseudodysenterie. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 57. H. 3.) — 3) Sucker, Die Isohämagglutinine des menschlichen Blutes und ihre rassenbiologische Bedeutung. (Ibid. Bd. 102. H. 3/4.) — 4) Paltauf, Die Agglutination. (Handb. von Kolle und Wassermann. Bd. 2.) — 5) Koose, Agglutination von Pseudoruhrbazillen durch Schwangerensera. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. H. 7/8.) — 6) Müller, Georg, Ueber Agglutinine normaler Tiersera. (Inauguraldissert. Bern. 1901.)

Nachdruck verboten.

Antiwutimpfung mittels Karbolvakzine nach der Methode von Prof. Fermi.

[Aus dem Pasteur-Institut zu Ufa, Rußland.]

Von Dr. **E. Nikolajewa.**

Auf die Gefahr der Anwendung des lebendigen, wenn auch durch Trocknen abgeschwächten Virus fixe hat Fermi mehrmals hingewiesen, wobei er sich auf seine Versuche mit Mäusen, Kaninchen und Hunden stützte (1).

Die Virulenz des Virus fixe verschiedener Institute ist in der Tat sehr verschieden und erreicht bisweilen hohe Grade. Fermi weist auf die ausschließliche Stärke von V. f. hin, welches man im Pasteur-Institut zu Sassari gebraucht. Dieses tötet Mäuse bei subkutaner Injektion in Verdünnungen von 1:50000—1:80000. Nach 1—2tägigem

Trocknen tötete das Mark bei subkutaner Injektion nicht nur Mäuse und Kaninchen, sondern auch Hunde. Sogar das Mark rief nach 8-tägigem Trocknen bei subduraler Injektion die Erkrankung hervor (2).

Das Virus fixe, mit dem gegenwärtig das Pasteur-Institut in Ufa arbeitet, tötet Meerschweinchen bei subduraler Injektion von 0,2 ccm einer 900fachen Verdünnung (1 MLD). 1918 verfügte das Institut über ein Virus fixe, welches Meerschweinchen bei Verdünnung von 1:20000 tötete (3). Ersteres wie letzteres Virus fixe rief nach 4—5-tägiger Inkubation Erkrankung hervor*).

Paralysisfälle, die nach der Antiwutimpfung vorkamen und in der Literatur erwähnt sind, sowie analoge Mitteilungen von Mitgliedern des 7. allrussischen Epidemiologen- und Bakteriologen-Kongresses zwangen uns, unsere Aufmerksamkeit auf die Immunisationsmethoden mit abgetötetem Virus zu lenken.

Ich kenne 2 solche Methoden: 1) Die von Cumming beschriebene und im Pasteur-Institut von Mitchigan angewendete und 2) die Methode von Fermi, nach der man in Sassari verfährt.

Die Methode von Cumming oder Dialysismethode ist unter russischen Verhältnissen und besonders in der Provinz kaum anwendbar. Sie besteht darin (4), daß das verriebene Gehirn mittels Dialyse in strömendem destillierten Wasser oder (der Schnelligkeit wegen) mit Formalin getötet und erst dann dialysiert wird, wobei man es vorläufig in Kollodiumsäckchen legt. Man setzt die Dialyse so lang fort, bis die Reaktion auf Formalin negativ ausfällt.

Die 2. Methode, die von Prof. Fermi, ist äußerst einfach (5). Um den Impfstoff zu erhalten, verreibt man das rabische Gehirn (Virus fixe) in toto in physiolog. Kochsalzlösung mit Zusatz von $1^1/_2$ Proz. Phenol, wobei man 10,0 g Gehirnsubstanz auf 100,0 g physiolog. Lösung nimmt. Nach einigen Stunden ist das Virus fixe getötet. Vor der Impfung verdünnt man es mit einer gleichen Menge physiolog. Kochsalzlösung. So erhält man eine 5proz. Gehirnsuspension, die 0,75 Proz. Phenol enthält. Man macht den Gebissenen täglich 2 Injektionen zu 3 ccm im Verlaufe von 25 Tagen. Das 10proz. Vakzin bleibt sehr lange unverändert.

Um antirabisches Serum zu erhalten, injiziert Fermi dem Pferde 2mal täglich je 10 ccm einer 5proz. Karbolvakzine im Verlaufe von 2 Monaten mit Zwischenräumen von 15 Tagen. 20 Tage nach Beendigung der Vakzination wird das Pferd zur Ader gelassen. Nach 8tägiger Erholung wird die Immunisation erneut.

Was Einfachheit der Vorbereitungsarbeit anbetrifft, läßt Fermis Methode nichts zu wünschen übrig. Sie beseitigt in der Tat die Gefahr der Ansteckung mit Tollwut, da die subdurale Injektion des so abgetöteten Virus selbst bei so tollwutempfindlichen Tieren wie Meerschweinchen keine Erkrankung hervorruft. Ich injizierte Meerschwein-

*) MLD. wurde nach Cumming (Journ. infect. Diss. 1914. No. 1) festgestellt. 1,0 g Gehirnsubstanz (Medulla oblongata) wurde 5 Min. mit derselben Menge Meersand verrieben. Dann fügte man allmählich 100,0 g physiol. Lösung hinzu. Die erhaltene Emulsion blieb in demselben Gefäße 24 Std. zum Absetzen. Hierauf wurden von der Oberfläche etwa 75 ccm Flüssigkeit abgesaugt und diese durch den Schleicher-Schillschen Papierfilter Nr. 595 filtriert. Die erhaltene Emulsion wurde als 1proz. betrachtet und dann weiter verdünnt.

Von diesem Verfahren habe ich 2 Abweichungen gemacht: 1) die verriebene Gehirnsubstanz wurde nicht 24, sondern nur 12 Std. lang stehen gelassen, und 2) wurde als Papierfilter nicht N 595, sondern 589 benützt.

chen sub duram je 0,2 ccm einer 12 Std. alten und bei Zimmertemperatur aufbewahrten Fermi-Vakzine, die vor der Impfung mit der gleichen Menge physiolog. Kochsalzlösung verdünnt wurde und nach der Verdünnung eine 5proz. Gehirnemulsion mit Zusatz von 0,75 Proz. Phenol war. Die Meerschweinchen erkrankten nicht.

0,2 ccm einer 1proz. Emulsion unseres Virus fixe, das nach 12stünd. Stehen durch Papier filtriert wurde, enthalten 9 MLD für Meerschweinchen bei Subduralinjektion. Das 5proz. Karbolvakzin aber, welches ich prüfte, wurde ohne Absetzen nur durch eine Schicht Gaze filtriert. So erhielten die Meerschweinchen sub duram viel mehr als 45 MLD. Dasselbe Resultat hat Cumming mit 1proz. Virus fixe, dem er 2 Proz. Phenol zugesetzt hatte, erhalten, Umberto Cano (6) mit 5—10proz. Virus fixe und 1 Proz. Phenol, Repetto (7) — mit 5proz. Virus fixe und 1,5 Proz. Phenol.

Im Gegensatz hierzu steht die Arbeit von Sawtschenko (8). Die Resultate seiner Impfung entsprechen der Phenolverdünnung und der Dauer von dessen Wirkung auf das Virus fixe nicht, weswegen seine Angaben nicht überzeugend sind.

Meine Versuche in dieser Beziehung haben folgende Resultate ergeben:

Geimpft wurden 12 Meerschweinchen, jedes ungefähr 350 g schwer. Die ersten 4 erhielten 15 Tage lang täglich je 0,5 ccm 5proz. Karbolvakzin subkutan. 4 Meerschweinchen der 2. Serie bekamen 3 Injektionen in steigenden Dosen (1,5; 2,5 und nochmals 2,5 ccm) in Zwischenräumen von 6 Tagen. Die letzten 4 Meerschweinchen bekamen 4 Injektionen ebenfalls in steigenden Dosen (1,5; 2,5 und 3mal je 4,0 ccm) in denselben Zeiträumen.

Nach Beendigung der Immunisation wurden die Meerschweinchen nach verschiedener Zeit auf ihre Immunität gegen verschiedene Quantitäten von MLD. Virus fixe subdural geprüft: Die der 1. Serie vertrugen 3 Tage nach Beendigung der Vakzination 2 MLD., nach 11 Tagen 3 MLD.; die der 2. Serie nach 5 Tagen 1 MLD., nach 14 Tagen 3 MLD., während die der 3. Serie 21 Tage nach Beendigung der Immunisation 4 MLD. vertrugen. Nach 31 Tagen, also 10 Tage später, wurde die Immunität nicht größer.

Bei allen Prüfungen wurden Kontrollversuche angestellt, wobei die Kontrolltiere jedesmal 1 MLD subdural erhielten, was in allen Fällen nach 4tägiger Inkubationsperiode die Erkrankung hervorrief.

Auf solche Weise gehen die Impfungen mit Fermi-Karbolvakzine schon 3 Tage nach Beendigung der Immunisation eine Immunität gegen 2 MLD, subdural injiziert, wobei dieselbe mit der Zeit noch anwächst, bis zum Ertragen von 4 MLD.

Cumming fand, nachdem er verschiedene Methoden der Schutzimpfungen verglichen hatte, daß die Methode von Högyes die Meerschweinchen von 1,5 MLD., subdural injiziert, schützt, die Methode von Pasteur von 2 MLD., die der Dialyse von 8 MLD. Nach meinen Versuchen schützen die Impfungen mit Karbolvakzine die Meerschweinchen nicht weniger als von 4 MLD.

Also gab die Karbolvakzine ein noch einmal so gutes Resultat, als die Impfung mit getrocknetem Mark und ein $2^1/_2$mal besseres, als die Arbeit nach der Methode von Högyes.

Was die Wirksamkeit der Impfmethoden nach der Quantität der Antikörper im Serum der Geimpften anbetrifft, so bietet das Serum eines von mir immunisierten Pferdes einen glänzenden Beweis für die Wirksamkeit der Methode von Fermi. Dieses Serum wurde 4 Jahre nach ihrer Herstellung erprobt, wobei sich erwies, daß das 50fach verdünnte Serum 1proz. Virus fixe neutralisiert, wenn es im Ver-

hältnis 1:1 gemischt wird. Bei 100facher Verdünnung des Serums wird die Inkubationsperiode bis auf 10 Tage verlängert (anstatt 4—5 Tage). Nach Analogie mit anderen Seren ist anzunehmen, daß es im Laufe der Zeit seine rabizide Wirkung teilweise verloren hat und daß sein Titer ursprünglich höher war. Dabei wurden dem Pferde im ganzen nur 1200 ccm 5proz. Karbolvakzine, d. h. 60,0 g Gehirnsubstanz oder ungefähr 5 Kaninchengehirne, eingeführt.

Wenn wir diese Methode mit der von Remlinger vergleichen, welchem es gelang, ein Hammelserum durch Einführung von 30—40 Kaninchengehirnen zu erhalten, das, mit 1proz. Virus fixe in gleichen Mengen gemischt, letzteres neutralisierte, so muß man der Karbolvakzine den Vorzug geben. Das rabizide Serum, welches nach Karnauchowa von einem Hunde mittels Immunisation mit sensibilisiertem Virus fixe erhielt, hatte auch beträchtlich niedrigere Titer, als das unsrige (9).

Bei der Blutuntersuchung der Gebissenen, die in unserem Pasteur-Institut mit Karbolvakzine geimpft wurden, erwies sich, daß das Serum 12 Tage nach Beginn der Impfung nicht imstande war, 1proz. Virus fixe im Verhältnis von 1:1 zu neutralisieren; 5 Tage später neutralisierte es schon 1proz. Virus fixe im Verhältnis 1:1 und 18 Tage nach Beendigung der Impfung wurde 1 ccm von 1proz. Virus fixe schon durch 0,5 ccm Serum neutralisiert. Größere Verdünnungen des Serums erfolgten nicht. Analoge Resultate gaben die Versuche mit Serum von 9 nicht gebissenen Personen. Diese Personen wurden 1- oder 2mal täglich mit Karbolvakzine in verschiedenen Zeiträumen geimpft. Das Serum eines jeden Geimpften wurde am 5.—7., am 10.—15. und am 25.—35. Tage nach Beendigung der Impfung geprüft. Das Virus fixe wurde in verschiedenen Verdünnungen mit dem Serum der Geimpften in gleichen Mengen gemischt. Die Verdünung wurde so gemacht, daß die Mischung eine bestimmte Menge von MLD. in 0,2 ccm enthielt. Die Mischung erfolgte unmittelbar vor der Operation.

Es erwies sich dabei, daß die Antikörper im Serum von Personen, die zweimal am Tage geimpft wurden, früher erschienen, als im Serum derjenigen, die täglich nur 1 Injektion erhalten hatten. Ob dies von der geringeren Menge der injizierten Vakzine abhing, oder die öftere Wiederholung der Injektionen von Einfluß darauf war, ist noch nicht aufgeklärt. 40 Tage nach Beginn der Impfung hatte sich das Resultat bei allen Geimpftenn ausgeglichen. Die Mehrzahl der Geimpften gab ein Serum, welches das Virus fixe in Verdünnung 1:112,5 neutralisierte, d. h. 4 MLD., die dem Meerschweinchen mit dem Serum gemischt injiziert wurden, riefen keine Erkrankung hervor. Die Verschiedenheit im Anwachsen der Immunität hängt, wie es scheint, auch noch von der Individualität des Geimpften ab.

Die Impfung mit Karbolvakzine erzeugt also eine Immunität, die jedenfalls nicht geringer ist, als eine mittels Immunisierung mit getrocknetem Mark erhaltene und deren Ausarbeitungsdauer nicht länger ist. Doch hat die Karbolvakzine den Vorzug der vollen Gefahrlosigkeit, der äußersten Einfachheit der Zubereitungstechnik, der Sterilität des Impfstoffes, der Möglichkeit, die Vakzine immer vorrätig zu halten und sie also in vom Pasteur-Institut entfernte Orte senden zu können, wodurch der Zeitraum zwischen Biß und Beginn der Impfung abgekürzt wird.

Seit 1909 begann Prof. Fermi bei den Schutzimpfungen auch

das antirabische Serum mit der Karbolvakzine zusammen anzuwenden. Solche Mischimpfungen gaben in Sassari vortreffliche Resultate. Prof. Fermi empfiehlt auf Grund der Ergebnisse von Marie (10) und Remlinger, den Ueberschuß von Serum in der Mischung zu vermeiden und sich gleich an ein Verhältnis zwischen Serum und Vakzine 1:3 zu halten.

1918 und 1919 wurden auch im Pasteur-Institut in Ufa Schutzimpfungen mit Mischungen von Karbolvakzine und Serum im erwähnten Verhältnisse gemacht und ebenfalls gute Resultate erhalten. Es gelang mir dabei nicht, experimentell festzustellen, ob das Serum wirklich eine große Rolle bei Schutzimpfungen spielt, da den Meerschweinchen beim Kontrollversuche zu viele letale Dosen von Virus fixe eingeführt wurden und die Tiere zugrunde gingen. Doch zeigt der 1. von meinen Vorversuchen, daß das antirabische Serum wirklich eine große Rolle bei den Schutzimpfungen spielen muß. Den Meerschweinchen wurde das Serum unter die Haut und gleichzeitig 1proz. Virus fixe (9 MLD.) subdural eingeführt. Die Meerschweinchen erkrankten nicht. Ebenso erkrankten sie nicht, wenn man ihnen das Serum unter die Haut 24 Std. vor der subduralen Injektion des Virus fixe einführte. Wenn das Serum aber 24 Std. oder noch später nach der subduralen Injektion von Virus fixe eingeführt wurde, rettete es die Tiere nicht.

Es ist interessant, diese Tatsachen mit der Mitteilung von Fermi (11) zusammen zu betrachten, daß es ihm gelungen ist, 50 Proz. der Mäuse, die 4 Tage vorher mit Virus fixe subkutan infiziert waren, mittels Serum zu retten, obgleich man schon zu dieser Zeit das Virus fixe im Gehirne nachweisen konnte, wogegen Straßenvirus erst 12 Tage nach dessen Einführung unter die Haut entdeckt werden konnte. Dennoch rettet Serum, das später als 8 Tage nach dem Virus eingeführt wird, die Tiere nicht.

Die Orientierungsversuche mit Impfungen von Virus fixe, das vorher mit dem antirabischen Serum sensibilisiert und dann vom Serum durch Waschen befreit wurde, zeigten: 1) daß nach der Sensibilisation das Virus fixe seine Virulenz verliert, 2) daß die Verbindung der rabiziden Stoffe des Serums mit dem Virus fixe eine feste ist und durch die Waschung mit physiolog. Lösung nicht zerstört wird, und 3) daß Ueberschuß von Serum in der Mischung nicht schadet im Sinne der Aufhebung der Neutralisation von Virus fixe. Die 2 letzten Tatsachen widersprechen den Hinweisen von Marie, welcher sagt, daß 1) die Verbindung der rabiziden Stoffe des Serums mit Virus fixe keine feste sei und bei dem Spülen zerstört wird und 2) daß man bei Zufügung des Serums im Ueberschuß dasselbe Resultat erhält wie bei ungenügender Menge des Serums. Marie hält nur die „neutrale" Mischung für nützlich, indem er als solche ganz willkürlich 1 ccm von 1proz. Virus fixe mit 1 ccm Serum ansieht.

Man muß annehmen, daß bei Schutzimpfungen mit Mischungen von Vakzin mit Serum der Ueberschuß des letzteren nicht die ihr von Marie zugeschriebene fatale Rolle spielt. Es ist im Gegenteil möglich, daß es bei verspätetem Beginn der Behandlung, besonders bei starken Bissen und Bissen in den Kopf, nützlich wäre, die Dosen des Serums bedeutend zu vergrößern.

Literatur.

1) Fermi, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 49. — 2) Ders., Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 51. — 3) Nikolajewa, Mitteil. d. baschkirischen Volksgesund-

heitsamts. 1923. Nr. 1. [Russ.] — 4) Cumming, Journ. Infect. Dis. Vol. 14. 1914. No. 1. — 5) Relatione dell'Istituto antirabbico di Sassari 1900—1911, compilata dal dott. Salvatore Zumban. — 6) Cano, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. — 7) Repetto, Ibid. Bd. 53. — 8) Sawtschenko, Charkoff. med. Journ. Bd. 10. 1910. Nr. 8. [Russ.] — 9) Karnauchowa, Ber. d. Tätigk. d. Bakteriolog. Instituts zu Perm bis 1922. [Russ.] — 10) Marie, Ann. Inst. Pasteur 1908. No. 1, und 1908. No. 3. — 11) Fermi, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 66.

Nachdruck verboten.

Tod an Lyssa nach dem Spielen mit einem Schoosshunde.

Von Dr. **Otto Herrmann,**
Chef des Pasteurinstituts in Poltawa.

Bekanntlich kann Lyssa nicht nur nach einem Bisse vom wutkranken Tiere, sondern auch nach Kratzwunden ausbrechen (Remlinger, Babes u. a. m.). Es sind auch Lyssafälle bei Menschen bekannt, welche von Hunden vorher geleckt worden waren (Pace, Remlinger etc.).

Auch experimentell wurde öfters die Tollwut bei Tieren hervorgerufen durch die unverletzte Nasenschleimhaut (Remlinger, Fermi), Conjunctiva (Galtier und Conte), durch die skarifizierte oder sogar nur rasierte Haut, welche im letzteren Falle unverletzt zu sein schien (Konrádi, Galli-Valerio, Remlinger u. a.).

Da der Geifer wutkranker Tiere schon lange vor dem Ausbruch der ersten Symptome infektiös sein kann, wenn die Eigentümer nicht nur außer acht lassen, wenn sie geleckt, sondern im Spiele auch gekratzt werden, so ist es ratsam, daß sich alle einem, wenn auch nur kurzen Schutzimpfungskursus unterziehen, bei denen die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, beleckt zu sein, resp. eine oberflächliche Hautverletzung im Laufe von ungefähr 2 Wochen vor Beginn der ersten Symptome oder sogar noch bedeutend früher (s. meinen Artikel: „Experimentelle und natürliche Lyssa recurrens") erlitten zu haben.

Besondere Aufmerksamkeit sollte man in dieser Hinsicht aber den Kindern zuwenden, welche während des Spiels nicht nur geleckt oder gekratzt, sondern vielleicht auch gebissen werden können, ohne daß die Eltern es erfahren.

Als recht belehrendes Beispiel kann folgender Fall dienen:

Ein Mädchen, M. D. R., 10 Jahre alt, aus Mirgorod, Poltawaer Gouvernement, erkrankte an Lyssa am 2. 9. 24. Am 5. 9. 24 trat die Hydrophobie ein. Am 6. 9. 24 erfolgte der Tod. Das Mädchen beteuerte den Eltern, daß sie weder gebissen, noch gekratzt worden sei. 3 Monate vorher war deren Schooßhund, welcher, wie angenommen wurde, sich durch einen Knochen erwürgt hatte, erkrankt.

Da das Mädchen schon 10 Jahre alt war, so könnte man vielleicht der Angabe, daß sie nicht gebissen wurde, einigen Glauben schenken. Viel weniger glaubwürdig erscheint aber die Angabe, daß sie auch keine Kratzwunden hatte, denn sogar Erwachsene können sich öfters nicht genau erinnern, ob sie nicht während des Spiels vom Hunde gekratzt worden sind, ungefähr 2 Wochen vor der Erkrankung desselben, wo der Geifer schon infektiös sein kann, sich aber noch niemand vor dem Hunde hütet.

Da das Mädchen mit dem später zugrunde gegangenen Hunde öfters gespielt hat, so ist selbstverständlich anzunehmen, daß sie von demselben, wenn auch nicht gebissen oder gekratzt, so doch oft geleckt (Hände oder Gesicht) worden war.

Jedenfalls sehen wir, daß das Kind nach dem Spiele mit einem an

Tollwut zugrunde gegangenen Hunde nicht schutzgeimpft wurde und 3 Monate darauf an Lyssa starb.

Literatur.

Fermi, Cl., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 44. 1907. — Galli-Valerio, Br., Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 42. 1906. — Herrmann, Otto, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 94. — Konrádi, Dan., Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 38. — Remlinger, P., Compt. Rend. Soc. de Biol. 1904. 1905. 1906. — Ders., Bull. Inst. Pasteur. 1904. p. 794.

Nachdruck verboten.

Die Virulenz der Zerebrospinalflüssigkeit beim wutkranken Menschen und die Vererbung der Wut.

Von Dr. **Otto Herrmann,**
Chef des Pasteurinstituts in Poltawa.

Mit 1 Abbildung im Text.

Ueber die Virulenz der Zerebrospinalflüssigkeit sind die Ansichten der Untersucher verschieden. Nach Pasteur, França und Konradi enthält der Liquor cerebrospinalis das Wutvirus, dagegen haben andere Untersucher, darunter besonders Fermi, nur negative Resultate erhalten. Fermi hat den Liquor von Kaninchen, Hunden, Ratten und Mäusen untersucht und denselben als avirulent befunden. Die positiven Resultate erklärt er dadurch, daß mit der Zerebrospinalflüssigkeit wahrscheinlich zugleich auch Gehirnsubstanz entnommen wurde.

In der diesbezüglichen Arbeit von Konradi, welche nach dem Artikel von Fermi erschienen ist, wird jedoch ausdrücklich betont, daß die dem lyssakranken Mädchen entnommene Flüssigkeit ganz klar war und dennoch der Wut die damit infizierten 2 Kaninchen (subdural resp. intraokulär) und 1 Meerschweinchen (subdural) erlagen.

Auch ich war in meinen Untersuchungen darauf bedacht, eine ganz klare Zerebrospinalflüssigkeit vom lyssakranken Manne Sk., 48 Jahre alt, zu erhalten. Der Frau Prof. Dr. Stanischewskaja, welche die Flüssigkeit 2 Tage vor dem Tode des Sk. entnommen und mir dieselbe zur Verfügung gestellt hat, spreche ich an dieser Stelle meinen Dank dafür aus.

Der Fall Sk. wurde meinerseits beschrieben in dem Artikel: „Die Virulenz des Speichels des lyssakranken Menschen und der Einfluß anderer Krankheiten auf den Verlauf der Tollwut". Sk. ist an der paralytischen Form der Wut erst 1 Jahr und 8 Monate nach der Beendigung der Schutzimpfungen gestorben. Die Aëro- und Hydrophobie war in diesem Falle nicht recht deutlich zu Tage getreten, so daß Frau Stanischewskaja, welche ihn behandelt hatte, zuerst Zweifel hegte, ob man es mit Tollwut zu tun hatte, und zwar um so mehr, da dieselbe durch gleichzeitigen Ausbruch der Dementia tabica etwas verschleiert wurde. Jedoch haben die nachfolgende Untersuchung des Gehirns auf Negri-Körperchen, welche im Ammonshorn gefunden wurden, und der Tod eines Kaninchens an Lyssa, welches mit der Gehirnaufschwemmung inokuliert wurde, die Diagnose auf Lyssa bestätigt.

Das Mädchen, welchem Konradi die Zerebrospinalflüssigkeit entnommen hat, starb an der Wut 14 Tage nach dem Bisse und des-

halb handelt es sich nach der Ansicht Konradis bei ihr um die stille Form der Wut, da dieselbe beim Menschen sich besonders nach schweren Verletzungen und kurzer Inkubation entwickelt. In unserem Falle dagegen brach die stille Wut, wie schon erwähnt, erst nach einer Inkubationszeit von 1 Jahr und 8 Monaten aus.

Kaninchen 47, welches subdural mit dem Gehirn des Sk. infiziert wurde, erlag der Wut nach 19 Tagen. Mit dem Liquor cerebrospinalis des Sk. wurden am 2. 7. 23 3 Kaninchen infiziert (Kan. 44 und 45 subdural und Nr. 46 intramuskulär).

Kan. 44 ging unter paralytischen Erscheinungen an Tollwut am 17. 3. 24 zugrunde, also 259 Tage nach der Infektion. Kan. 155, welches sub duram mit dem Gehirn des Kan. 44 am 18. 3. 24 infiziert wurde, erlag der Wut nach 92 Tagen.

Kan. 45 starb an der Wut nach 273 Tagen. Es war nur etliche Tage augenscheinlich krank, verlor jedoch an Gewicht allmählich trotz fortwährender normaler Temperatur. Am 8. 2. 24 wog es 2975 g, am 30. 3. 24, also am Tage vor dem Tode, nur 2100 g.

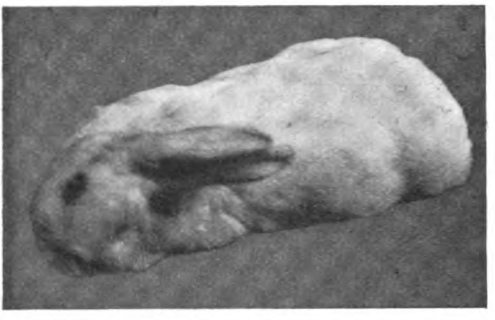


Fig. 1.

Wir sehen daraus, daß die Zerebrospinalflüssigkeit in unserem Falle sich als infektiös erwies, jedoch war sie bei weitem nicht so virulent wie das Gehirn, da nach subduraler Infektion letzteres das Kaninchen nach 19 Tagen, der Liquor dagegen Kaninchen erst nach 259 resp. 273 Tagen tötete.

Noch schwächer erwies sich die Zerebrospinalflüssigkeit gegenüber dem Kaninchen 46 (Gew. 1360 g) bei intramuskulärer Infektion (ca. 5 ccm).

Kan. 46 erkrankte am 14. 11. 23, also nach 135 Tagen. Es saß zusammengekauert, stand nicht sicher auf den Beinen und bekam einen krummen Hals, daß der Kopf sich ungefähr auf 90° umdrehte. Das rechte Auge mit einem recht stark ausgedrückten Exophthalmus kam dabei nach oben zu stehen. Es war kaum in den Händen zu halten, da es dann sofort mit dem Kopfe energische Drehungen machte. Auf der Wagschale konnte es nicht sitzen. Der Kopf hing dann hilflos herab und es verlor sofort das Gleichgewicht. Die Temperatur war meistens normal, nur selten zeigte sich geringe Temperatursteigerung. Es fing an, an Gewicht zu verlieren. Am 12. 11. 23 wog es 2700 g, am 12. 12. 23 nur 2370 g. Von da an fing das Gewicht wieder zu steigen an, so daß es am 25. 2. 25 schon 3225 g waren. Das Kaninchen stand nun wieder ziemlich sicher auf den Beinen, der Torticollis ist aber bis jetzt, also nach 15 Monaten, noch nicht vergangen. Hin und wieder wurde Besserung und dann wieder Verschlechterung beobachtet. Am 15. 5. 24, also während der Krankheit warf es 5 Junge, welche im Laufe des Juni 1924 zugrunde gingen, außer 1 (Nr. 161), bei welchem zu der Zeit sich ebenfalls wie beim Muttertier, Torticollis bildete, so daß ein Auge zur Erde, das andere nach oben gerichtet war. Am 27. 7. 24 starb auch dieses Kaninchen. Mit dem Gehirn desselben (aus dem Glyzerin genommen), wurden am 1. 8. 24 intrazerebral Meerschw. 162 und 163 und subdural Kan. 164 infiziert. Seitdem sind schon 7 Monate vergangen, die Versuchstiere sind aber immer noch gesund.

Kan. 46 (mit Torticollis) warf wiederum 7 Junge am 2. 9. 24. Davon gingen 2 in den ersten Tagen zugrunde, die 5 andern blieben gesund und wurden nach 4—5 Monaten zu anderen Zwecken verwendet. Mit dem Gehirn des 1 von den 2 zugrunde gegangenen Jungen wurden Meerschw. 190 und 191 intrazerebral infiziert. Beide sind noch nach 6 Monaten am Leben.

Kan. 46 hat zum 3. Mal anfangs Februar 1925 Junge geworfen. Alle starben am anderen Tage. Am 6. 2. 25 wurden mit der Gehirnaufschwemmung von 3 der-

selben intrazerebral 4 Meerschw. (247—250) infiziert, die vorläufig noch alle gesund sind.

Wir sehen somit, daß das Kan. 46 während der schon 15 Monate dauernden chronischen Wut 3mal Junge geworfen hat, welche entweder gesund heranwuchsen, oder auch zugrunde gingen, obgleich sie weder Wutvirus im Gehirn enthalten hatten, oder dasselbe so abgeschwächt war, daß mit den Gehirnaufschwemmungen derselben 8 Meerschw. und 1 Kan. resultatlos infiziert wurden, obwohl sich beim Kan. 161 vom Muttertier sogar Torticollis vererbt hatte. Betreffs der Vererbung der Wut möchte ich auf meinen Artikel: „Die Vererbung der Wut durch die Plazenta" hinweisen.

Gestützt auf meine Untersuchungen muß ich França und Konradi beistimmen, daß die Zerebrospinalflüssigkeit beim lyssakranken Menschen virulent ist, jedoch glaube ich kaum, daß dieselbe sich sehr für diagnostische Zwecke eignet. Man kann den Liquor cerebrospinalis meiner Ansicht nach nur dann verwenden, wenn aus irgendeinem Grunde (wie im Fall Konradis) das Gehirn nicht zu erhalten ist. In solchen Fällen sollte man auch das Blut prüfen (s. meinen Artikel: „Die Ansteckungsfähigkeit des Blutes bei Lyssa humana"), da letzteres bedeutend leichter zu entnehmen ist, die Resultate dagegen mit demselben nicht schlechter ausfallen, als mit der Zerebrospinalflüssigkeit.

Zusammenfassung.

Die paralytische Form der Wut kann beim Menschen nicht nur nach kurzer, sondern auch nach sehr lange (1 Jahr und 8 Monate) dauernder Inkubation vorkommen.

Das Lyssavirus kann beim Durchgang durch die Plazenta beim chronisch lyssakranken Kaninchen so abgeschwächt werden, daß es nicht mehr im Gehirn der durch Vererbung erkrankten Kaninchen entdeckt werden kann. Chronisch wutkranke Tiere können auch gesunde Nachkommenschaft haben.

Der Liquor cerebrospinalis beim lyssakranken Menschen ist zwar infektiös, jedoch kann derselbe bei gleichzeitig sehr virulentem Gehirn sehr abgeschwächt sein, und ist daher zu diagnostischen Zwecken wenig geeignet. Er sollte nur parallel mit dem Blutversuche verwendet werden, und zwar nur dann, wenn aus irgendwelchem Grunde keine Möglichkeit ist, das Gehirn zu untersuchen. Man muß in solchen Fällen, mehr vielleicht als irgendwo anders, darauf bedacht sein, daß nur positive Resultate die Diagnose bestätigen, da die negativen Resultate gar nichts beweisen.

Literatur.

Fermi, Cl., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 44. 1907. — França, Carlos, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 55. 1910, und Bd. 57. 1911. — Herrmann, Otto, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 94. 1924 und 1925. — Ders., Wratschebnaja Gasetta (russisch). Leningrad. 1924. Nr. 19—20. — Konradi, Dan., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88. 1922.

Nachdruck verboten.

Intrazerebrale oder subdurale Infektion der Kaninchen ohne Assistenten.

Von Dr. **Otto Herrmann,**
Chef des Pasteurinstituts in Poltawa.

Als die besten Methoden der Infektion der Kaninchen, was den Effekt der Impfungen anbelangt, muß man immer noch die klassische subdurale Methode von Pasteur-Roux, die Modifikation derselben, die von Babes empfohlen worden ist, und die intrazerebrale von Leclainche-Morel betrachten.

Die von mir angewandte Modifikation ist eine Kombination derselben, nur ist der Hautschnitt $^1/_2$—1 cm lang (anstatt dem üblichen 3 cm langen) und wird auf denselben keine Ligatur gelegt, weil sie bei meiner Modifikation aus folgenden Gründen überflüssig erscheint. Die Haut auf dem Kopfe des Kaninchens ist sehr beweglich. Vor der Trepanation verschiebe ich sie so, daß der Hautschnitt dann zwar über die Stelle kommt, wo der Schädel durchbohrt wird, nach der Infektion jedoch, da die freigelassene Haut sich wieder zurückzieht, die durchbohrte Oeffnung von der Haut wieder ganz verdeckt wird und die kleine Hautwunde sich nun über dem unversehrten Periost befindet.

Die Oeffnung im Schädel kann mit einem beliebigen ahlenförmigen Instrumente gemacht werden, nur muß dasselbe ganz aus Metall sein, damit es stets vor und nach der Operation in Spiritus eingetaucht (auch Denaturat verwendbar) auf der Spiritusflamme oder in einem Schüsselchen desinfiziert werden kann. Ich benütze dazu einfach ein Handtrepan ohne Krone.

Als geringer Uebelstand bei dieser Modifikation, welcher aber auch den Methoden von Leclainche-Morel und Babes eigen ist, ist der Umstand zu betrachten, daß man zuweilen mit dem Stift ins Blutgefäß gerät und dann die mit dem Blute bedeckte Oeffnung mit der Spitze der Nadel dem Gefühl nach gefunden werden muß, was, da der Schnitt sehr klein ist, bei einiger Uebung nicht schwer fällt. In solchem Falle genügt es aber auch, ein Stückchen in Karbollösung getränkter Watte auf die blutende Stelle einige Augenblicke zu legen, wonach die durchbohrte Oeffnung wieder sichtbar wird. Bei meiner Modifikation kann höchstens die Hautwunde auch auf eine andere Stelle, evtl. auch auf die andere Seite der Stirn geschoben werden, um dort den Schädel noch einmal zu perforieren.

Diese Methode, welche sehr einfach ist, hat noch den Vorzug, daß man die Trepanation ohne Assistenten ausführen kann und daß dieselbe außerdem sehr wenig Zeit erfordert, so daß ich manchmal bei meinen Versuchen auf diese Weise 15—20 Kaninchen in ungefähr 1 Std. infiziert habe.

Nach dieser Methode werden schon über $^1/_2$ Jahr im Poltawaer Pasteurinstitut die Passagekaninchen mit dem Virus fixe infiziert. Alle diese Kaninchen sterben, wenn sie nicht am 6. Tage während der Agonie entblutet werden, regelmäßig nach 6 Tagen, falls sie jung sind, die älteren Tiere aber erst nach 7 Tagen. Zu dieser Zeit ist die Hautwunde schon ganz zusammengezogen, und auf dem Schädel zeigt nur ein ganz kleiner dunkler Fleck die Stelle der Perforation.

Die Technik der Trepanation ist folgende: Das Haar wird auf der Stirn abgeschoren und das Kaninchen, wie üblich, auf dem Bauch fixiert. Die zur Operation nötigen Utensilien: Skalpell, Trepan, Spritze mit der zu injizierenden Flüssigkeit und Karbollösung mit Stückchen Watte darin, müssen bequem bei der Hand sein. Nachdem die Stirn des Tieres mit der Karbollösung benetzt worden ist, wird die Haut auf dem Kopfe von der Mitte zur Seite und nach hinten zum Genick geschoben, danach fixiert man dieselbe und zugleich den Kopf mit dem Daumen und dem Zeigefinger der linken Hand, welche die Schläfen umfassen. Mit dem Skalpell, welches sehr scharf sein muß, macht man dann einen $^1/_2$—1 cm langen Schnitt durch die ganze Haut bis zum Periost links oder rechts von der medialen Linie, um beim Trepanieren den Sinus zu schonen. Etwas über der die beiden oberen Augenwinkel verbindenden Linie durchbohrt man mit dem Perforator den Schädel, indem man die Tiefe des Eindringens des Instruments mit der Spitze des rechten ausgestreckten Zeigefingers reguliert, falls eine spezielle Einrichtung dazu fehlt. Gleich darauf sticht man durch die Oeffnung die Nadel der Spritze 2—5 mm tief in das Gehirn und injiziert 0,1—0,3 ccm der entsprechenden Flüssigkeit. Anstatt einer geraden Nadel kann man auch eine krumme gebrauchen, um mit derselben nicht intrazerebral, sondern subdural zu injizieren. Während der intrazerebralen Injektion muß der Kopf des Kaninchens besonders vorsichtig fixiert werden, um eine Bewegung desselben zu verhindern, da die darauf folgende Beschädigung des Gehirns den Tod des Tieres sofort oder im Laufe des nächsten Tages nach sich ziehen kann.

Nachdem die Nadel der Spritze vorsichtig entfernt wurde, läßt man die Kopfhaut frei, wonach dieselbe sich wieder auf die ursprüngliche Stelle zurückzieht und zugleich die Oeffnung im Schädel verdeckt. Die Umgegend der nun über dem unversehrten Periost befindlichen kleinen Hautwunde wird mit in Karbollösung getränkter Watte abgewischt und die Wunde mit Jodoform bestreut.

Nachdruck verboten.

Ueber die Dauerhaftigkeit der Immunität gegen Tollwut.

[Aus dem Odessaer Bakteriologischen Institut und dem Poltawaer Pasteur-Institut.]

Von Dr. **Otto Herrmann,**
Vorstand des Poltawaer Pasteurinstituts

Hin und wieder findet man in der speziellen Literatur Bemerkungen darüber, daß es eine solide, ja sogar absolute natürliche (angeborene) und auch passive und aktive, durch irgendwelche Schutzimpfungen erworbene Immunität gegen Tollwut gibt. Als Beweis der ersteren Behauptung wird angegeben, daß sogar unter den Passagekaninchen, welche sub duram mit fixem Virus infiziert werden, ein Teil am Leben bleibt, während die andere dadurch bewiesen wird, daß ein

Teil der intensiv immunisierten Tiere sogar eine nachträgliche subdurale oder intraokuläre Infektion übersteht.

Högyes betrachtet eine solche Unempfindlichkeit als absolute Immunität. In einem Falle hat er etlichen Hunden intraperitoneal eine Gehirnemulsion eines immunisierten Hundes einverleibt; dieser Hund war nach Angabe von Högyes absolut immun. Dieser Hund wurde nämlich etliche Male resultatlos intraokulär infiziert und lebte danach noch 9 Jahre.

Nach Babes ist die Unempfindlichkeit, infolge welcher die immunisierten Tiere eine nachfolgende subdurale Infektion überleben, eine solide; er gibt dabei an, daß diese Immunität etliche Jahre andauert.

Weder Babes noch Högyes geben aber an, mit welchem Virus diese mit einer soliden oder absoluten Immunität versehenen Tiere infiziert worden sind, ob mit fixem oder Straßenvirus. M. E. muß bevor irgendein Versuchstier als absolut immun gegen Tollwut anerkannt werden kann, dasselbe vorher subdural mit dem einen und mit dem anderen Virus etliche Male versuchsweise infiziert werden.

Um zu prüfen, ob die angeborene Immunität eine absolute ist, habe ich 10 Passagekaninchen, welche 1923 in der Pasteurschen Abteilung des Odessaer Bakteriologischen Institutes nach der subduralen Infektion mit fixem Virus am Leben geblieben waren, zum 2. Mal auf dieselbe Weise infizieren lassen, und zwar nach 14, 15, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 32 und resp. 43 Tagen nach der 1. Trepanation. Von diesen 10 Kaninchen überlebte die 2. Trepanation nur 1. Alle anderen erlagen der Wut ohne Verzögerung, außer 1, welches nach 8, anstatt 6—7 Tagen starb. Das am Leben gebliebene Kaninchen wurde 26 Tage nach der 2. Operation zum 3. Mal subdural mit Virus fixe infiziert und ging an Wut ohne Verzögerung zugrunde. Es ist daher wohl anzunehmen, daß es keine absolute angeborene Immunität gegen Tollwut gibt. Das Ueberleben der subduralen Infektion bei einigen Passagekaninchen läßt sich wohl einigermaßen durch eine gewisse Unempfindlichkeit gegen die Wut erklären, was aber wohl hauptsächlich davon abhängen wird, daß während der Operation unter die Dura mater zu wenig von dem Wutgifte appliziert worden ist (der größte Teil der eingespritzten Emulsion kann entweder mit dem hervorquellenden Blute ausgewaschen werden, oder wird hin und wieder unter Druck herausgespritzt[1]).

Gibt es nun eine absolute erworbene Immunität? Bekanntlich widersteht nach einer intensiven Immunisation der größte Teil der Versuchstiere der subduralen Infektion mit Straßenvirus und ein gewisser Teil auch einer solchen mit fixem Virus. Man sollte daher annehmen, daß diese Tiere absolute oder wenigstens langdauernde Immunität besitzen, was jedoch Experimente nicht bestätigen.

Es überlebten nämlich nach intensiven Schutzimpfungen eine subdurale Infektion mit fixem Virus 5 Kaninchen, sie erlagen, als sie nach 45—155 Tagen zum 2. Male auf dieselbe Weise infiziert wurden, der Wut ohne Verzögerung, außer 1, welches nach 10, anstatt 7 Tagen zugrunde ging[1]). Es ist somit auch die aktive Immunität nicht nur nicht absolut, sondern nicht einmal besonders dauerhaft. Um so mehr wird dies der Fall sein mit der passiven Immunität.

---

1) Vgl. die Beschreibung in meiner Arbeit: Immunisation gegen Tollwut mit verschiedenen Vakzinen.

Babes betont, daß es schwer ist, zu bestimmen, wie lange die Immunität nach den Schutzimpfungen bei Menschen währt. Bekannt ist, daß ein Mann, der sich nach einem Bisse im Dezember 1891 Schutzimpfungen vom 19. 12. 1891 bis 2. 1. 1892 unterworfen hatte, und der nach fast 4 Jahren, nämlich am 7. 9. 1895, noch einmal gebissen worden war, jedoch sich nicht zum 2. Male impfen ließ, 2 Monate darauf an Lyssa gestorben ist. Babes schließt daraus, daß die aktive Immunität beim Menschen nach 4 Jahren schon verschwindet; da aber die Immunität bei Tieren mehr als 2 Jahre dauern kann, meint er, daß man Schutzgeimpfte, wenn sie zum 2. Male gebissen werden, nicht wieder zu impfen braucht, wenn der Biß nicht später als $1^1/_2$ Jahre nach der Immunisation erfolgt ist.

Dieser Schluß scheint nicht recht begründet zu sein, da Babes ebendaselbst sich auf die Arbeit von Högyes bezieht, der angibt, daß bis 21 Proz. der immunisierten Tiere die Immunität schon kurz nach 1 Jahre verlieren.

Da die Dauer der Immunität von großem praktischen Interesse ist, sollte diese Frage gründlich bearbeitet werden, ehe man sich entscheiden darf, wie Babes vorschlägt, die Impfung nicht zu wiederholen, wenn vom Tage der Beendigung der Schutzimpfungen bis zum 2. Bisse nicht mehr als $1^1/_2$ Jahre verstrichen sind.

Ich halte es deswegen jetzt noch für meine Pflicht, allen denen, die sich an mich betreffs der Wiederholung der Impfung wenden, zu sagen, daß die Immunität gegen Lyssa von verschiedener Dauer sein kann und deshalb alle, die zum 2. Male gebissen werden, sich wiederum an das Pasteur-Institut zu wenden haben. Ist jemand während der Schutzimpfungen zum 2. Male gebissen, so berücksichtige ich die frühere Behandlung und verlängere sie nötigenfalls oder nicht. Hat z. B. der Patient das 1. Mal eine oberflächliche Verletzung des entblößten Fußes erlitten und ist ihm eine 16tägige Kur verordnet worden, und ist er nun zum 2. Male am Kopfe gebissen worden, wobei eine 28tägige Kur verordnet wird, so verlängere ich dieselbe um die fehlenden 12 Tage. Wird dagegen ein am Kopfe Gebissener zum 2. Male am Fuß oder Arme verwundet, so wird die früher verordnete maximale Kur von 28 Tagen verordnet. Erscheint Pat. nach Beendigung der Kur, aber nicht später als nach 3 Monaten, mit einer neuen Verletzung, so wird er einer verkürzten, falls er aber nach 3 Monaten kommt, einer neuen vollständigen Kur unterworfen.

Zusammenfassung.

Eine absolute angeborene Immunität existiert wahrscheinlich nicht. Das Ueberleben einer gewissen Zahl von Passagekaninchen nach der subduralen Infektion mit fixem Virus läßt sich vielleicht teilweise durch die natürliche Unempfindlichkeit etlicher Kaninchen erklären, doch ist wohl hauptsächlich zu berücksichtigen, daß nicht immer unter die harte Hirnhaut ein genügendes Quantum von Wutgift gelangt.

Die aktive Immunität, welche nach den antirabischen Impfungen entsteht, ist keine absolute. Sie ist nicht einmal immer von langer Dauer, da die Versuchstiere, welche in meinen Versuchen nach der

Immunisation die subdurale Infektion mit Virus fixe überstanden, nach $1^1/_2$—5 Monaten eine 2. Infektion nicht mehr überlebten.

Da die Dauerhaftigkeit der erworbenen Immunität unzulänglich ist, halte ich es für nötig, bei wiederholten Bißverletzungen eine 2. Kur zu verordnen, wenn dieselben 3 Monate nach den Impfungen erfolgt sind. Sind nicht 3 Monate seitdem vergangen, so hängt die Behandlung von dem Charakter der neuen Verletzung ab und ist nötigenfalls die Kur entsprechend zu verlängern.

Literatur.

Babes, W., Traité de la rage. 1912. p. 442. — Herrmann, O, Immunisation gegen Tollwut mit verschiedenen Vakzinen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 94. 1925.) — Högyes, A., Lyssa. (Spez. Pathol. u. Therap. von Nothnagel. 1897.)

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Morphologie der Spirochaeta pallida.

[Aus dem Bakteriologischen Laboratorium des Botanischen Institutes der kgl. ungar. Hochschule für Berg- und Forstingenieure und des Elisabeth-Spitals in Sopron (Ungarn).]

Von Primarius Dr. **J. Szilvási** und Prof. Dr. **D. Fehér.**

Mit 2 Tafeln.

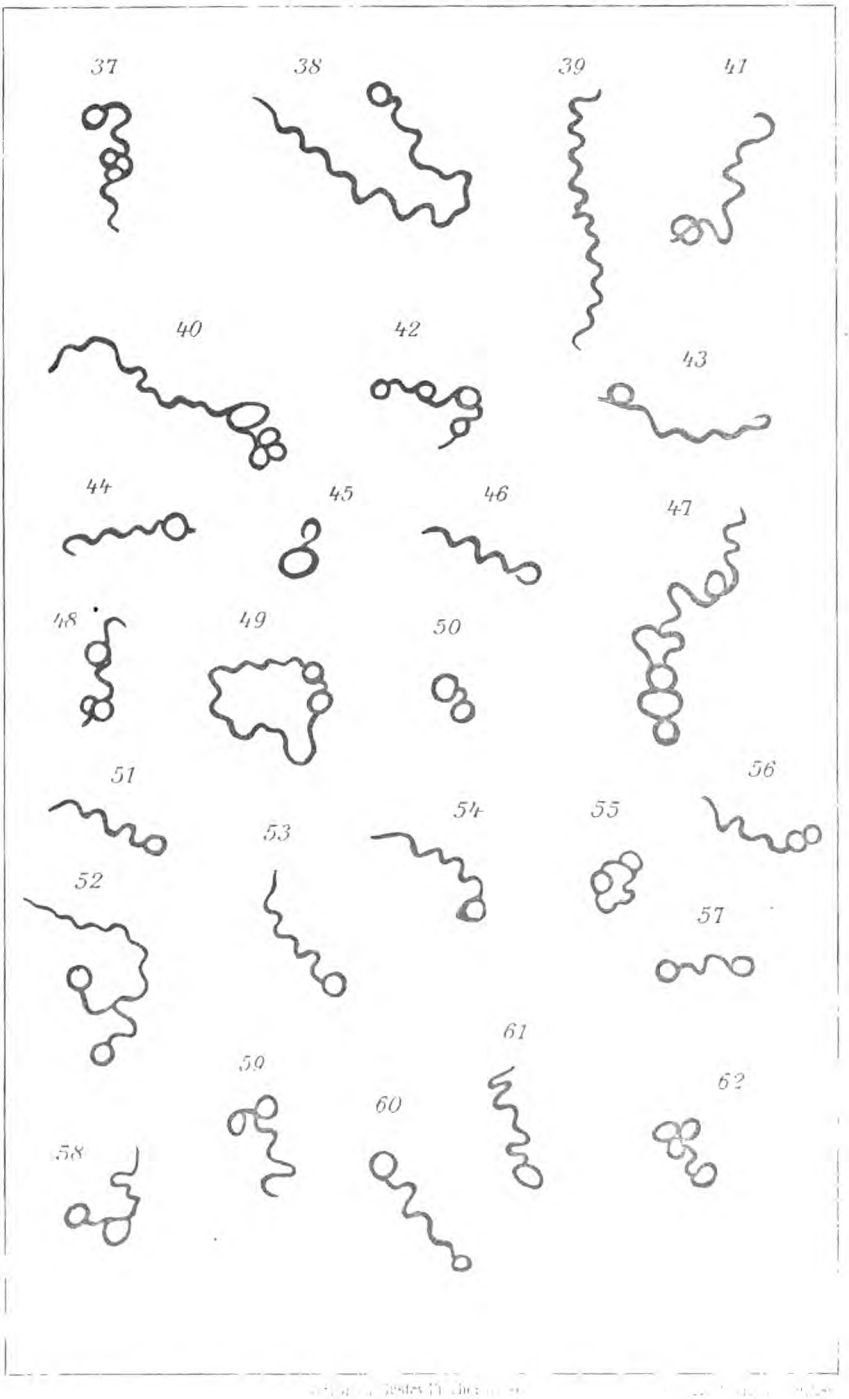
Szilvási hat 1924 auf dem Münchener Medizinischen Kongreß, wo er seinen neuen Spirochätenfarbstoff „Spirsil" (1) und das daran geknüpfte einfache diagnostische Färbverfahren im Rahmen eines Vortrages besprochen hat, gezeigt, daß die zuerst von Meirovsky beschriebenen morphologischen Eigentümlichkeiten der Sp. pallida mit seinem Farbstoff vollkommen einwandfrei, deutlich und in verhältnismäßig kurzer Zeit nachzuweisen sind.

Unsere Beobachtungen weichen jedoch von jenem Meirovskys insoweit ab, als es uns gelungen ist, diese eigentümlichen Formen des Syphiliserregers nicht nur bei den sekundären, sondern fast ebenso deutlich auch bei den primären Affektionen mit dem erwähnten Verfahren in kürzester Zeit nachzuweisen.

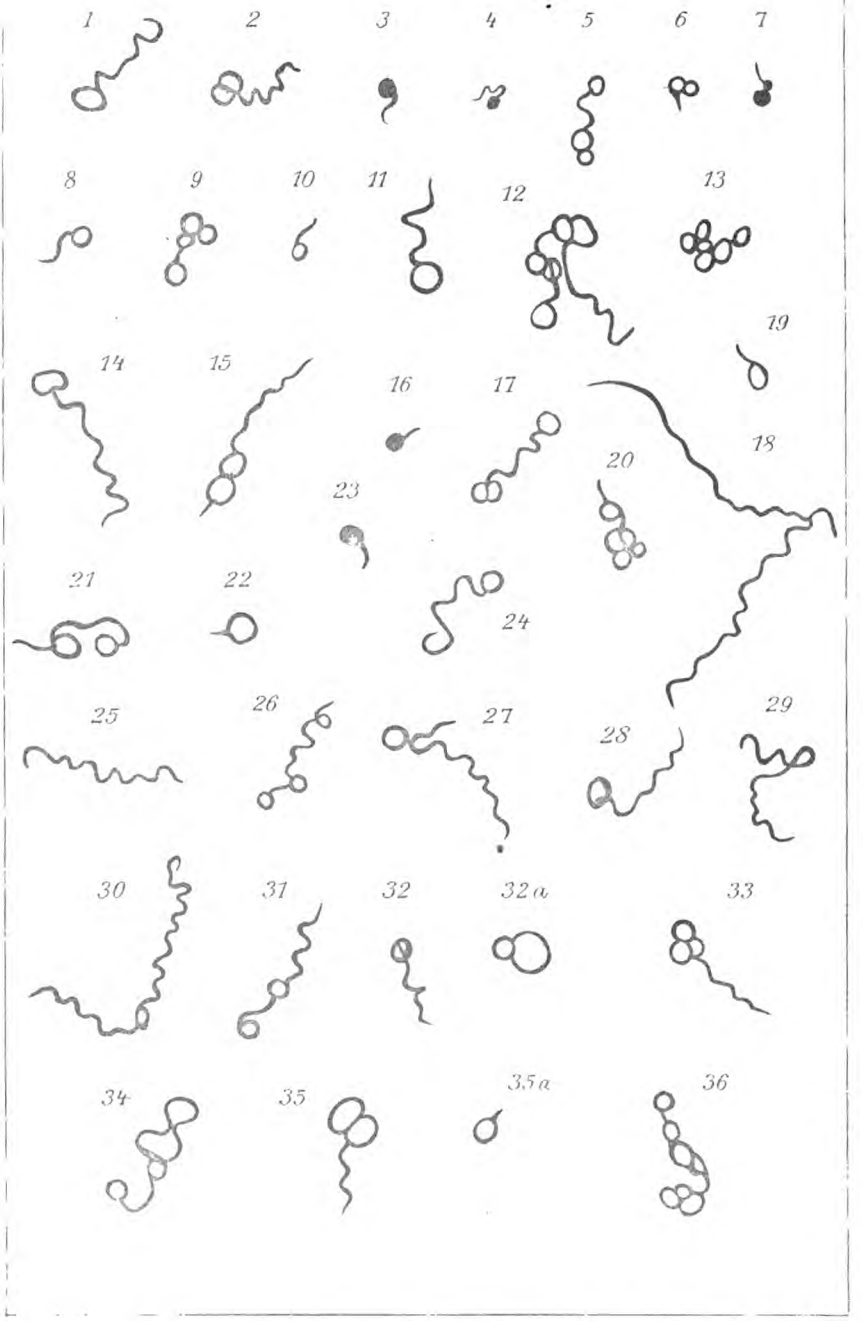
Das Verfahren ist folgendes (1):

Der Infektionsstelle (Primäraffektion) frisch entnommenes Material wird 1—2 Min. mit 96proz. Alkohol auf dem Objektträger fixiert, in Leitungswasser eingetaucht und gleich darauf, ohne das Austrocknen abzuwarten, mit dem Farbstoff 3—5 Min. behandelt. Nach Entfernen des überflüssigen Farbstoffes und kurzem Eintauchen in Leitungswasser wird das Präparat gleich mikroskopisch untersucht. Bei getrocknetem Material kann dasselbe auf dem Objektträger ohne vorherige Fixierung mit dem Farbstoff behandelt werden. In richtig gefärbten Präparaten erscheinen die Spirochäten hellrot und zeigen besonders deutlich ihre charakteristischen morphologischen Eigenschaften.

THE LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS


37
38
39
41
40
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
53
54
55
56
52
57
61
59
60
62
58

THE LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF ILLINOIS


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
32a
33
34
35
35a
36

Im Laufe der letzten Jahre sind in der dermatologischen Abteilung des Soproner Elisabeth-Hospitals einige Tausend Präparate in der beschriebenen Weise behandelt worden, die zu der einwandfreien Feststellung führten, daß die zuerst von Meirovsky beschriebenen Formen nicht nur bei sekundären, sondern auch bei primären Affektionen ausnahmslos vorkommen. Einige von den vielen von uns angefertigten Zeichnungen, die ausschließlich aus Präparaten der Primäraffekte entnommen wurden, die diese eigentümlichen Formen nach Originalpräparaten darstellen, schließen wir bei.

Die Zeichnungen sind je einem einzigen Präparat einer primären Affektion entnommen worden. Die fraglichen Formen kommen in unseren mit dem „Spirsil" behandelten Präparaten derart häufig vor, daß durch sie die normalen Formen fast gänzlich in den Hintergrund treten.

Die Zusammensetzung und die Verwendung des angewendeten Farbstoffes schließt die Möglichkeit einer Auflösung oder sekundären Formänderung der Spirochäten vollkommen aus.

Was nun die Deutung dieses Formwechsels anbelangt, so wollen wir unsere Ansicht erst später auf Grund der noch fortgesetzten Untersuchungen äußern. Schon jetzt glauben wir jedoch, auf Grund des untersuchten Materials bemerken zu dürfen, daß außer den von Meirovsky beschriebenen Entwicklungsstadien auch Formvarietäten vorkommen, die eventuell als Involutionsformen aufgefaßt werden könnten.

Literatur.

1) Klin. Woch. Jg. 3. Nr. 26; Arch. f. Dermatol. u. Syph. Bd. 145. 1924. S. 265; Wien. klin. Woch. 1924. Nr. 19. — 2) E. Meirowszky: Studien über die Fortpflanzung von Bakterien, Spirillen und Spirochäten, 1914

Erklärung der Tafelabbildungen.

1. Ganz junges Entwicklungsstadium mit sporenähnlicher Formausbildung: 3, 4, 7, 8, 10, 16, 19, 22, 23, 32, 35. a. — 2. Mittlere Entwicklungsstadien mit einer einzigen Endknospe. 1, 11, 24, 32, 44, 45, 46, 51, 54, 53, 61. — 3. Dasselbe mit einer einzigen Seitenknospe. 43, 30. — 4. Mittlere Entwicklungsstadien mit mehreren Endknospen. 2, 6, 33, 35, 41, 56, 58, 59. — 5. Mittlere Entwicklungsstadien mit End- und Seitenknospen. 21, 26, 31, 29, 48, 58. — 6. Mittlere Entwicklungsstadien mit Endknospen an beiden Enden. 5, 9, 17, 50, 57, 60, 62. — 7. Aeltere Formen mit End- und Seitenknospen. 12, 15, 27, 29, 30, 37, 38, 40. — 8. Gabelige Verzweigung eines älteren Spirochätenleibes: 18. — 9. Aelteres Stadium mit gabeliger Verzweigung und Endknospen: 52. — 10. Normale Entwicklung: 39, 25. — 11. Formen, deren Deutung vorläufig unsicher ist (Involutionsformen): 13, 20, 34, 32, a. 36, 55, 49. — 12. Formen, die wahrscheinlich durch zufälliges Zusammentreten mehrerer Spirochäten entstanden sind: 47, 36.

Gezeichnet mit Zeiß Ap. 1,5 und Kompens.-Ok. 18, Vergrößerung ca. 3000, mit dem Abbeschen Zeichenapparat, nach einem einzigen, mit Spirsil gefärbten Präparat einer primären Affektion.

Nachdruck verboten.

Studien über die Beziehungen zwischen der Haupt- und Mitagglutination.

XII. Mitteilung: Ueber eine neue Unterart von Paratyphus B-Bazillen.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität zu Sendai (Direktor: Prof. Dr. K. Aoki).]

Von Dr. **Kikuo Sakai.**

Die Mikroben, welche zu der Gruppe der Paratyphus B-Bazillen gehören, sind außerordentlich weit verbreitet und miteinander so nahe verwandt, daß man sie nicht nur mikroskopisch und kulturell, sondern auch pathogenetisch nicht unterscheiden kann. Ebenso sind sie agglutinatorisch gegenseitig so stark beeinflußbar, daß man bis jetzt dadurch irgendeine sichere Einteilung dieser Gruppe nicht vornehmen konnte.

Schon bei der Untersuchung dieser Mikroorganismen durch gekreuzte Agglutination fand Aoki einen Stamm, welcher bei der Immunisierung des Kaninchens ein Serum erzeugen kann, das sowohl bei Fleischvergiftungen als auch bei Tiererkrankungen gefundene Stämme dieser Mikroben bis zum Titer, die Paratyphus B-Bazillen von Schottmüller aber nur ganz schwach agglutiniert. Aoki nannte diesen Stamm die Aertryckform der Mäusetyphusbazillen.

Daraufhin untersuchte ich agglutinatorisch über 300 Stämme aus der Gruppe der Paratyphus B-Bazillen mit dem oben angegebenen Serum. Es wurde dabei festgestellt, daß man durch Anwendung dieses Serums Paratyphus B-Bazillen aus typhösen Erkrankungen von Menschen von den andern, welche bei Fleischvergiftungen und Tiererkrankungen nachgewiesen worden waren, ganz deutlich differenzieren kann.

Es wäre nun zur Einteilung dieser Mikroben ebenso angenehm, wenn man einen solchen Stamm auch unter den Paratyphus B-Bazillen vom Schottmüller-Typus finden könnte, welcher nur in Paratyphus B-Schottmüller-Seris bis zum Titer, in allen Mäusetyphusseren aber fast nicht agglutiniert, und ferner ein Serum beim Kaninchen erzeugen könnte, welches Paratyphus B-Bazillen bis zum Titer, Mäusetyphusbazillen aber nicht agglutiniert, wie die Aertryckform der Mäusetyphusbazillen.

Aoki hat zufällig bei seinen Untersuchungen schon über die Paratyphusbazillengruppe ein Serum, welches Paratyphus B-Bazillen bis zum Titer, Mäusetyphusbazillen aber gar nicht agglutiniert, bemerkt. Dieses Serum wurde deswegen von uns immer P. B. 37 (Kaninchennummer 505) genannt und zu diagnostischem Zwecke gebraucht. Ich untersuchte mit diesem Serum schon ca. 300 Stämme der Paratyphus B-Bazillengruppe agglutinatorisch. Es wurde dabei festgestellt, daß in diesem Serum ohne Ausnahme alle Paratyphus B-Bazillen bis zum Titer, aber alle Mäusetyphusbazillen ganz schwach agglutinieren. Nach diesem Befunde hielt ich es für sehr nötig, zu untersuchen, ob der Stamm, mit dem das Serum

P. B. 37 (Kaninchennummer 505) hergestellt war, bei Kaninchen immer ein Serum erzeugen kann, welches, wie oben beschrieben ist, wirkt.

Zu diesem Zwecke wurden 3 Kaninchen mit diesem Stamme P. B. 37 vorbehandelt. Das Immunisierungsverfahren war folgendes: 24 Std. alte Agarkultur wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Diese Aufschwemmung wurde bei 60° C 10 Min. lang erhitzt. Dieses Impfmaterial wurde 3 Kaninchen in verschiedenen, sich immer steigernden Dosen in 7tägigen Intervallen 2mal subkutan eingespritzt. Blutproben wurden am 7. Tage nach jeder Vorbehandlung den Ohrvenen entnommen und jedesmal auf den Titer der Hauptagglutination des homologen Stammes und den Titer der Mitagglutination von Mäusetyphusbazillen im engeren Sinne geprüft. Ganz gegen meine Erwartung ergab sich dabei, daß alle 3 Immunsera sowohl den homologen Stamm, als auch die Mäusetyphusbazillen im engeren Sinne fast gleich stark bis zum Titer agglutinieren.

Nun fragt es sich, woher es kommt, daß einmal jenes Serum, ein andermal diese Sera hergestellt wurden, obwohl die Tiere immer mit demselben Stamme, nämlich P. B. 37, vorbehandelt worden waren.

Schon Konno und ich beobachteten die gleiche Erscheinung bei den Mikroben der Aertryckform, welche bei einer Fleischvergiftung in Koriyama gefunden worden waren. Diese Mikroben zeigten anfangs ein typisch agglutinatorisches Verhalten, denn sie agglutinierten im Paratyphus B-Serum ganz schwach. Dieser Zustand änderte sich aber durch mehrmalige Umzüchtungen so, daß sie endlich im Paratyphus B-Serum sehr stark reagierten. Infolgedessen wurde diese Kultur in Kolonien zerlegt und agglutinatorisch untersucht. Dabei wurden zweierlei Kolonien nachgewiesen, von denen die eine im Paratyphus B-Serum sehr stark, fast bis zum Titer, und die andere, welche der originalen Form entspricht, sehr schwach agglutiniert. Wenn man diese einzelnen Kolonien mehrmals umzüchtete, so stammte von einer Art der Kolonie die andere Art derselben ab. Die ganz gleiche Erscheinung beobachtete ich ferner neuerdings bei den Stämmen, welche bei einer Nahrungsmittelvergiftung in der japanischen Feldarmee in Spaskaya von Kajitsuka gezüchtet worden waren.

Also darf ich wohl annehmen, daß die oben beobachtete Erscheinung dadurch zustande gekommen ist, daß unser Stamm durch lange Aufbewahrung und mehrmalige Umzüchtungen sich so variiert hat, daß er im Mäusetyphusserum stark agglutinieren kann.

Unser Stamm war in unserer bakteriologischen Sammlung 7—8 Jahre aufbewahrt und dabei mehrmals auf Nähragar umgeimpft worden. Infolgedessen ist es auch denkbar, daß dieser Stamm in dieser Zeit so umgewandelt war, daß er wie gewöhnliche Paratyphus B-Bazillen reagierende Kolonien neu bilden kann.

Auf Grund dieser Annahme wurde diese Kultur durch Plattenverfahren in Kolonien zerlegt. Es ergab sich dabei, daß der Stamm P. B. 37 zweierlei Kolonien enthielt, von denen die eine in den beiden Seren der Paratyphus B-Bazillen, P. B. 12 und P. B. 37, bis zum Titer, in dem Serum der Mäusetyphusbazillen im engeren Sinne, Ms. 8, ebenfalls sehr stark, aber in dem Serum der Mäusetyphusbazillen der Aertryckform, Ms. 34, ganz schwach und die andere in den beiden Paratyphus B-Sera bis zum Titer, aber in beiden Mäusetyphusseris ganz schwach beeinflußt wurde. Bequemlichkeitshalber wurde erstere als a-Form und letztere als b-Form bezeichnet (Tab. I).

Tabelle I.

Name der Immunsera		K. 477 P. B. 12	K. 505 P. B. 37	K. 437 Ms. 8	K. 1280 Ms. 34	K. 1350 E. G. 3	K. 1355 E. G. 18
Name der Bakterien	Titer	5,000	5,000	10,000	5,000	5,000	5,000
a-Form	P. B. 37 (2)	5,000	5,000	5,000	100—	100—	100—
	„ „ (7)	5,000	5,000	5,000	100—	100—	100—
	„ „ (9)	5,000	5,000	5,000	100—	100—	100—
	„ „ (10)	5,000	5,000	5,000	100—	100—	100—
b-Form	P. B. 37 (32)	5,000	5,000	100—	100—	100—	100—
	„ „ (55)	5,000	5,000	100±	100—	100—	100—
	„ „ (65)	5,000	5,000	100±	100—	100—	100—
	„ „ (88)	5,000	5,000	100±	100—	100—	100—
	„ „ (96)	5,000	5,000	100—	100—	100—	100—

Daraufhin konnte ich durch Immunisierung der Kaninchen mit den oben genannten reinen Stämmen den Stämmen entsprechende Sera herstellen. Die Sera wurden auf folgende Weise sorgfältig hergestellt: Um Verunreinigung der einen Form durch die andere zu vermeiden, wurden die Kulturen beider Formen beim Gebrauche durch Plattenverfahren in Kolonien zerlegt. Diese Kolonien, welche dabei in den oben genannten Seren als a-Form und b-Form recht deutlich reagierten, wurden auf Schrägagar geimpft. Sie wurden am folgenden Tage in denselben 4 Seris in vitro genau agglutinatorisch untersucht, um festzustellen, welche Kultur sicher als a-Form und welche sicher als b-Form reagiert. Die Aufschwemmung der Kulturen, welche dabei als a-Form oder b-Form typisch reagierten und noch übrig geblieben sind, wurde bei 60° C 10 Min. lang erhitzt. Dieses Impfmaterial wurde Kaninchen subkutan eingespritzt. Das gleiche Verfahren wurde bei jeder nachfolgenden Vorbehandlung immer neu ausgeführt. Auf diese Weise wurden Tiere mit sich stetig steigernder Dose in 7tägigen Intervallen 4mal subkutan vorbehandelt. Durch diese exakte Methode wurden 3 Kaninchen mit a-Form-Stämmen, nämlich P. B. 37 (2), P. B. 37 (7), P. B. 37 (9), und noch 5 Kaninchen mit b-Form-Stämmen, nämlich P. B. 37 (32), P. B. 37 (55), P. B. 37 (65), P. B. 37 (88) und P. B. (96), vorbehandelt. In den dabei hergestellten Seren wurden reine a- und b-Form-Stämme gegenseitig agglutinatorisch geprüft. Es ergab sich, daß alle Sera Stämme der a- und b-Form gegenseitig gleich stark bis zum Titer agglutinieren können. Daraufhin wurden in den Seris, welche mit den Stämmen der a-Form hergestellt worden waren, ein Paratyphus B-Stamm von Schottmüller, P. B. 12, 2 repräsentierende Mäusetyphusstämme, nämlich Mäusetyphusbazillen im engeren Sinne Ms. 2 und Mäusetyphusbazillen der Aertryckform, Ms. 34 und 2 Stämme Gärtner-Bazillen, E. G. 3 und E. G. 18, agglutinatorisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Sera der a-Form nicht nur die homologen Stämme, sondern auch den heterologen Paratyphusstamm und den einen Stamm Mäusetyphusbazillen — Ms. 2, gleich stark oder fast bis zum Titer agglutinieren. Aber der noch übrig bleibende Mäusetyphusstamm Ms. 34 wurde dabei ganz schwach wie Gärtner-Bazillen agglutiniert (Tab. IIa). Ferner wurden dieselben Bakterien in den Seren der b-Form agglutinatorisch geprüft. Diese Sera agglutinierten den heterologen Stamm der Paratyphus B-Bazillen gleich

Tabelle IIa.

Name der Immunsera / Name der Bakterien		K. 1845 P.B. 37 (2)	K. 1846 P.B. 37 (7)	K. 1847 P.B. 37 (9)
a-Form	P.B. 37 (2)	10,000	10,000	5,000
	„ „ (7)	10,000	10,000	5,000
	„ „ (9)	10,000	10,000	5,000
b-Form	P.B. 37 (32)	10,000	10,000	5,000
	„ „ (55)	10,000	10,000	5,000
	„ „ (65)	10,000	10,000	5,000
	P. B. 12	10,000	10,000	5,000
	Ms. 2	10,000	5,000	2,000
	„ 34	100—	100	100
	E. G. 3	100—	100—	100—
	„ 18	100—	100—	100—

stark wie die homologen Stämme, dagegen die beiden Stämme der Mäusetyphusbazillen sehr schwach, ebenso wie Gärtner-Bazillen (Tab. IIb).

Tabelle IIb.

Name der Immunsera / Name der Bakterien		K. 2181 P.B. 47 (32)	K. 2182 P.B. 37 (55)	K. 2183 P.B. 34 (65)	K. 2184 P.B. 37 (88)	K. 2185 P.B. 37 (96)
b-Form	P.B. 37 (32)	20,000	20,000	5,000	10,000	20,000
	„ „ (55)	20,000	20,000	5,000	10,000	20,000
	„ „ (65)	20,000	20,000	5,000	10,000	20,000
	„ „ (88)	20,000	20,000	5,000	10,000	20,000
	„ „ (96)	20,000	20,000	5,000	10,000	20,000
a-Form	P.B. 37 (2)	20,000	20,000	5,000	10,000	20,000
	„ „ (7)	20,000	20,000	5,000	10,000	20,000
	„ „ (9)	20,000	20,000	5,000	10,000	20,000
	P.B. 12	10,000	20,000±	5,000±	10,000±	10,000
	Ms. 2	200	500	100	200	500
	„ 34	100	200	100	100	100
	E.G. 3	100	100	100	100	100
	„ 18	100	100	100	100	100

Um diese Ergebnisse noch sicherer zu stellen, wurden in den Seren der b-Form 60 Stämme der Paratyphus B-Bazillen und Mäusetyphusbazillen im engeren Sinne agglutinatorisch geprüft. Das Resultat war ganz gleich. Alle ersteren Stämme agglutinierten nämlich so stark wie die homologen Stämme, dagegen reagierten alle letzteren Stämme ohne Ausnahme ganz schwach, nämlich in den Seris, deren Titer von 1:10000 bis 1:20000 war, 1:100 oder 1:200.

Ferner muß untersucht werden, ob die Stämme der b-Form, auch wenn Tiere überimmunisiert würden, doch immer Sera darstellen könnten, welche so, wie oben beschrieben, reagieren. Zu diesem Zwecke wurden 5 Kaninchen mit steigenden Dosen von 5 Stämmen der reinen b-Form über 10mal vorbehandelt. Dabei wurden immer dieselben Vorsichtsmaßregeln angewandt. Zuerst wurde eine Dose von $^1/_{100}$ Agarkultur,

dann $^1/_{10}$ und schließlich von 6 Agarkulturen einverleibt. Jeden 7. Tag nach der Vorbehandlung wurde den Ohrvenen eine Blutprobe entnommen. In den Seren wurden jedesmal nicht nur homologe und heterologe Paratyphus B-Bazillen, sondern auch Mäusetyphusbazillen agglutinatorisch geprüft. Wie schon Aoki und Konno mitgeteilt hatten, wurde dabei der Bruch, dessen Nenner den Titer Paratyphus B-Bazillen, nämlich die Hauptagglutination, dessen Zähler den Titer Mäusetyphusbazillen, nämlich die Mitagglutination darstellt, ausgerechnet. Es ergab sich folgendes: Der Bruch zeigte sich im Anfang der Vorbehandlung von $^1/_2$—$^1/_{10}$ groß. Dieser Wert nahm bei weiteren Vorbehandlungen allmählich immer mehr ab, bis er bei der 4. Einspritzung den tiefsten Punkt erreichte während der ganzen Immunisierungszeit, nämlich von $^1/_{40}$—$^1/_{100}$. Von diesem Zeitpunkt an begann er mit den weiteren Impfungen allmählich wieder zuzunehmen, so daß er von der 8. bis zur 10. Impfung einen Wert von $^1/_{25}$—$^1/_{10}$ erreichte. Doch konnte ich nie einen so hohen Wert wie $^1/_1$ bekommen (Tab. III).

Tabelle III.

Zahl der Vorbehandlungen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ms. 2 / P. B. 37 (32)	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{50}$	$^1/_{100}$	$^1/_{40}$	$^1/_{20}$	$^1/_{10}$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{10}$
Ms. 2 / P. B. 27 (55)	$^1/_{20}$	$^1/_{25}$	$^1/_{25}$	$^1/_{40}$	$^1/_{20}$	$^1/_{20}$	$^1/_{70}$	$^1/_{25}$	$^1/_{10}$	$^1/_{25}$
Ms. 2 / P. B. 37 (65)	$^1/_2$	$^1/_{10}$	$^1/_{40}$	$^1/_{50}$	$^1/_{50}$	$^1/_{20}$	$^1/_{10}$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{10}$
Ms. 2 / P. B. 37 (88)	$^1/_{20}$	$^1/_{25}$	$^1/_{50}$	$^1/_{50}$	$^1/_{20}$	$^1/_{20}$	$^1/_{10}$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{10}$
Ms. 2 / P. B. 37 (96)	$^1/_5$	$^1/_{50}$	$^1/_{40}$	$^1/_{40}$	$^1/_{20}$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{25}$	$^1/_{20}$	$^1/_{25}$

Durch alle obigen Resultate wurde ganz sicher nachgewiesen, daß man mit diesem Stamm P. B. 37 immer mit Sicherheit ein Serum erzeugen kann, wenn es bei der Vorbehandlung der Kaninchen immer in reiner Form gebraucht wird, was zuerst von Aoki bemerkt worden ist. Wie verhält sich nun diese reine Form von P. B. 37 den Paratyphus B-Bazillen von Schottmüller gegenüber? Sie reagierten sowohl mikroskopisch und kulturell als auch agglutinatorisch und absorptorisch gegenseitig ganz ähnlich, so daß man die beiden nicht unterscheiden kann. Doch war den anderen Seren gegenüber ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden nachzuweisen. Denn wenn auch typische Schottmüller-Bazillen in einer Art von Mäusetyphussera stark agglutinieren können, so war doch unser Stamm P. B. 37 darin ganz schwach reagierbar, wie oben genau auseinandergesetzt worden ist. Dazu kann man noch andere Differenzen zwischen den beiden Stämmen 2 weiteren Seren gegenüber, nämlich den Sera von Hogcholerabazillen und atypischen Paratyphusbazillen, P. A. 1, nachweisen. Letztere Bazillen waren die, welche in letzter Zeit von unserem Institute und von Shimojo gefunden und als neue Arten von Paratyphusbazillen angenommen wurden. Während der Immunisierung von Kaninchen mit Hogcholerabazillen

agglutinierten die Paratyphus B-Bazillen von Schottmüller sehr stark, dagegen unser Stamm P. B. 37 sehr schwach. Der Bruch der Haupt- und Mitagglutination, welcher bei der Immunisierung der Kaninchen mit Hogcholerabazillen bei den Schottmüller-Bazillen P. B. 1 ausgerechnet wurde, betrug nach den ersten Vorbehandlungen der Tiere $^1/_5$. Dann wurde er $^1/_{10}$. Dieser Wert wurde mit den weiteren Vorbehandlungen immer größer, so daß er bei der 6. Vorbehandlung $^1/_2$ betrug. Dagegen betrug er bei unserem Stamme nach der 1. Vorbehandlung $^1/_{10}$. Bei weiterer Vorbehandlung wurde er immer kleiner, so daß er nach 6maliger Einspritzung minimal, nämlich $^1/_{200}$ wurde. Gleiches Verhalten wurde bei der Immunisierung der Kaninchen mit atypischen Paratyphusbazillen, P. A. 1, nachgewiesen. Der Bruch der Haupt- und Mitagglutination, welcher bei der Immunisierung mit P. A. 1 den Schottmüller-Bazillen gegenüber ausgerechnet war, war im Anfang $^1/_{20}$, dann $^1/_{50}$ und am Ende $^1/_{10}$. Dagegen betrug der Wert des Bruches bei unserem Stamme im Anfang $^1/_{20}$, dann $^1/_{200}$, endlich $^1/_{40}$ (Tab. IV).

Tabelle IV.

Zahl der Vorbehandlungen	1	2	3	4	5	6
P. B. 1 / Hogcholera	$^1/_5$	$^1/_5$	$^1/_{10}$	$^1/_4$	$^1/_2$	$^1/_2$
P. B. 37 / Hogcholera	$^1/_{10}$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{40}$	$^1/_{100}$	$^1/_{200}$
P. B. 1 / P. A. 1	$^1/_{20}$	$^1/_{50}$	$^1/_{40}$	$^1/_{20}$	$^1/_{10}$	$^1/_{10}$
P. B. 37 / P. A. 1	$^1/_{20}$	$^1/_{200}$	$^1/_{200}$	$^1/_{100}$	$^1/_{100}$	$^1/_{40}$

Zum Schlusse möchte ich hinzufügen, daß außer dem Stamm P. A. 37 noch 2 andere Stämme in unserer bakteriologischen Sammlung aufbewahrt werden. Sie sollen aus typhösen Erkrankungen von Menschen gezüchtet worden sein.

Schlußbetrachtung.

Nach den obigen Ergebnissen kann man wohl annehmen, daß eine Variante der Paratyphus B-Bazillen von Schottmüller vorhanden ist, welche bei Kaninchen ein Immunserum darstellen kann, welches Schottmüller-Bazillen bis zum Titer, aber andere ihnen verwandte Bakterien, besonders die Gruppe der Mäusetyphusbazillen, entweder ganz schwach oder fast gar nicht agglutiniert. Ferner zeigt sich diese Variante dadurch, daß sie selbst im Schottmüller-Serum bis zum Titer, aber im Mäusetyphusserum nicht reagiert. Dieser Befund muß für die Differentialdiagnose der Paratyphus- und Mäusetyphusbazillen nützlich sein, ebenso wie der andere Befund, welcher schon von Aoki mitgeteilt worden ist. Er fand nämlich eine Variante der Mäusetyphusbazillen, die nur

im Mäusetyphusserum, aber nicht im Paratyphus B-Schottmüller-Serum agglutinieren kann. Diese Variante veranlaßte ihn, bei Kaninchen ein Serum herzustellen, welche Mäusetyphusbazillen bis zum Titer, aber Paratyphus B-Bazillen gar nicht beeinflußt. Falls diese beiden Varianten von beiden Seiten, nämlich einerseits von den Schottmüller-Bazillen, anderseits von den Mäusetyphusbazillen zur Benutzung herangezogen werden, so können diese gegenseitig so nahe verwandten Bakterien immer sicherer differenziert werden.

Literatur.

1) Aoki, Tohoku Journ. Exp. Med. Vol. 2. 1921. p. 131. — 2) Sakai, Ibid. Vol. 3. 1922. p. 341. — 3) Ders., Ibid. Vol. 5. 1924. p. 275. — 4) Konno u. Sakai, Ibid. Vol. 3. 1922. p. 333. — Sakai, Ueber B. Paratyphus B-Gruppe-Bazillen, welche bei einer Nahrungsmittelvergiftung gefunden worden waren. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 1925. — 6) Aoki u. Konno, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 86. 1921. S. 139. — 7) Aoki u. a., Ueber Paratyphus A-ähnliche Bazillen. (Tohoku Journ. Exp. Med. Vol. 6. 1925.)

Nachdruck verboten.

Bakteriologische Blutuntersuchungen nach Operationen.

[Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg
(Vorstand: Geh. Rat Prof. Dr. F. König).]

Von Prof. **E. Seifert.**

Von jeher haben gewisse klinische Erfahrungen zu der Annahme gezwungen, daß auch im Verlauf örtlich begrenzter chirurgischer Infektionen zu gewissen Zeiten eine vorübergehende Ausschwemmung der Eitererreger in die Blutbahn vorkommen kann. In den Arbeiten der letzten Jahre pflegt diese Annahme mit einer erstaunlichen Sicherheit geäußert zu werden, so daß doch die Frage nach dem Beweis für solche Angaben gestellt werden muß. Man sucht indessen vergebens in der gesamten Literatur, vor allem der chirurgischen, nach einer Aufklärung in dieser Richtung. Planmäßige Untersuchungen fehlen; kasuistische Mitteilungen sind spärlich. Ein Analogon liefern allerdings die bakteriologischen Forschungen der Gynäkologen, besonders der Winterschen und Schottmüllerschen Schule: nach Ausräumung infizierter Aborte ist in einem beträchtlichen Teil der Fälle eine vorübergehende Bakteriämie nachweisbar, die mit nur geringen klinischen Erscheinungen einhergehen, zuweilen auch ohne jede äußerlich wahrnehmbare Reaktion bleiben kann. Es ist demnach nicht unwahrscheinlich, daß sich an einem rein chirurgischen Material bei planmäßiger Versuchsanordnung und entsprechender Untersuchungstechnik gleichartige Ergebnisse erreichen ließen.

Ich habe versucht, diesem Ziele nachzugehen und an rund 300 klinischen Fällen den bakteriologischen Nachweis solcher vorübergehender Keimaussaat ins Blut zu führen.

Wenn überhaupt im regelrechten Verlauf chirurgischer Eiterungen mit einer gelegentlichen Bakteriämie zu rechnen war, so mußte die bakteriologische Blutuntersuchung mit größter Wahrscheinlichkeit gerade im Anschluß an einen operativen Eingriff zum Erfolg führen.

Zwei Vorbedingungen waren zu erfüllen: 1) mußte vor der Operation das Blut als keimfrei erwiesen sein; 2) war auf die Identität der im Krankheitsherd und der im Blut gefundenen Keime Wert zu legen, wenn die Befunde Beweiskraft beanspruchen wollten.

Es hat sich nun gezeigt, daß in der Tat in etwa der Hälfte (45 Proz.) aller Operationen in infiziertem Gebiet die Krankheitserreger wenige Minuten nach dem Eingriff im strömenden Blut sich nachweisen lassen; eingerechnet sind hierin große und kleine Operationen ohne Auswahl.

Damit war an sich noch nicht allzuviel gewonnen; denn es schien von geringerer Wichtigkeit, die Tatsache an sich zu beweisen, als vielmehr die Bedingungen aufzufinden, unter denen es mit einer gewissen Gesetzmäßigkeit (im Anschluß an Operationen) zu einer vorübergehenden postoperativen Bakteriämie kommt.

Durch Verarbeitung des gesamten, zunächst recht unübersichtlichen Untersuchungsmaterials, das sich auf nur kritisch geprüfte und kontrollierte Befunde stützt, ergibt sich eine Gruppierung nach folgenden Richtungen:

Es liegt auf der Hand, daß die postoperative Bakteriämie nach Eingriffen in eitrig erkranktem Gewebe eine höchst komplexe Funktion darstellt; ihre wichtigsten Glieder möchte ich in 3 Reihen ordnen:

Einmal ist die Natur des Erregers von gewissem Einfluß. Staphylokokken z. B. gingen in 52 Proz. (d. h. in 52 von 100 Staphylokokkeneiterungen) nach der Operation ins Blut über, wobei die Zahl der auf 1 ccm Blut treffenden Keime zwischen 1 und 150 schwankte. Die Neigung zur Blutaussaat ist bei den übrigen Eitererregern geringer; für Streptokokken ergab sich ein Verhältnissatz von 30 Proz., für Bact. coli ein solcher von 25 Proz. Erfahrungen an sonstigen Keimen, wie Pneumokokken, Bac. fusiformis, Pseudomilzbrand usw., stehen mir in größerem Umfang nicht zu Gebote, so daß ich über sie keine Verhältniszahlen bringen möchte.

Aus 18 positiven Fällen von Mischflora am primären Krankheitsherd gelangten 13mal Staphylokokken, 4mal Bact. coli, 2mal Streptokokken nach der Operation vorübergehend ins strömende Blut.

Wichtiger als die Art der Erreger sind die anatomischen Verhältnisse am Krankheitsherd selbst. Der Nachweis, daß für den durch die Operation ausgelösten Transport in den Kreislauf ausschließlich der Venenweg in Betracht kommt, läßt sich unschwer führen. Nun wird man von vornherein geneigt sein, einem an Venenmaschen reichen Gebiet eine besondere Disposition zur postoperativen Keimverschleppung ins Blut zuzuschreiben. Meine Erfahrungen bestätigen diese Vermutung. Hierfür ein Beispiel: Operationen an eitrig erkranktem Knochen ergaben in 60 Proz., Eingriffe an infizierten Weichteilen in 42 Proz. eine Bakteriämie. Außerdem scheint auch das Alter des örtlichen Krankheitsprozesses nicht bedeutungslos zu sein. Operationen an ganz frischen Infektionen z. B. waren in über der Hälfte der Fälle von einer Bakteriämie gefolgt; bei älteren (seit mehr als 10 Tagen bestehenden) Eiterungen geschah dies nur in einem Fünftel. Das Alter der Kranken, die Anlegung der Esmarchschen Blutleere u. ä. scheint

keinen wesentlichen Einfluß auf die Entstehung der postoperativen Bakteriämie zu haben.

Vom Standpunkt des Klinikers aus beansprucht der dritte Faktor die größte Beachtung. Man wird vermuten dürfen, daß je mehr bei der Operation der Mechanismus des Einpressens der Keime in die Venenlichtungen nachgeahmt wird, desto leichter die Bakteriämie zustande kommt. Dieser Annahme entsprechen die Erfahrungen Schottmüllers, der bei digitaler Ausräumung des puerperalen Uterus in 77 Proz., bei Ausschabung nur in 25 Proz. eine Bakteriämie erhielt. Diesen Zahlen stellen sich meine an vielseitigem chirurgischen Material gewonnenen gleichwertig an die Seite: Bei schonender Ausführung des Eingriffes entstand in einem Siebtel der „möglichen" Fälle die postoperative Bakteriämie, bei grobem Vorgehen trat sie dagegen in zwei Drittel der Fälle auf — sicherlich ein eindrucksvoller Unterschied.

Schließlich mag noch erwähnt werden, daß ich in fast einem Viertel der Fälle von sog. akzidenteller Verletzung einen positiven Bakterienbefund im Armvenenblut erheben konnte, wobei der jeweilige Verschmutzungsgrad der Wunde keine Rolle zu spielen scheint.

Meine Blutbefunde nach aseptischen Operationen sowie bei Peritonitis sind in mehrfacher Richtung verwendbar; ihre Wiedergabe würde hier zu weit führen.

Alle näheren Angaben über die Technik der Untersuchung, Einzel- und Besonderheiten in der Versuchsanordnung, spezielle Zahlenwerte, klinische Bedeutung der postoperativen Bakteriämie werden aus dem Verhandlungsbericht des Chirurgenkongresses 1925 zu ersehen sein. Im Vorstehenden wollte ich lediglich der bakteriologischen Fachwelt einen kurzen Auszug aus meinen klinisch-bakteriologischen Untersuchungen auf rein chirurgischem Arbeitsfeld übergehen.

Nachdruck verboten.

The Gram Staining Properties of the Micrococci.

[New York Agricultural Experiment Station, Geneva, N. Y.]

From **G. J. Hucker.**

The Gram stain is a commonly used diagnostic test for the rapid differentiation of various species of bacteria encountered in the laboratory. For some time the Gram reaction has generally been regarded as constant and a character whereby certain organisms could be roughly classified. Certain strains of the micrococci as Micrococcus aureus and M. albus have been regarded as invariably Gram positive while the more saprophytic types as M. luteus and M. varians have been classed as Gram negative. Sometime ago it was pointed out (Hucker and Conn 1921) that the Gram reaction was not constant and depended upon several factors including method used, age, as well as the type of organism. Some groups appeared to be more constant than others even where conditions were allowed to vary. Certain strains of micrococci appeared to be the most variable of any of the groups studied

and for this reason it was decided to make a more intensive study of this group to determine, if possible, its Gram reaction and to ascertain if this character is sufficiently constant to be used in routine diagnostic work (Hucker, 1924).

Methods.

In order to gain a broader knowledge of the staining reactions of this group, a series of micrococci were stained with five different methods. In staining the organisms by the various methods, preparations were made of each culture from 24 hour, 2-day, 3-day, 5-day, 7-day and 30-day agar slant cultures. Such preparations were stained (in triplicate) with the following procedures:

Procedure Nr. 1. Sterling method. (See Hucker and Conn 1922).

Procedure Nr. 2. Ammonium oxalate method (Hucker 1921).

Procedure Nr. 3. Buchanan method. (Buchanan 1911).

Procedure Nr. 4. Same as Nr. 3, with the exception that al to 10 alcoholic-aqueous solution of pyronin was used as a counterstain.

Procedure Nr. 5. Same as Nr. 4 with exception that acetone was used as the decolorizing agent in the place of alcohol.

The preparations, after being stained by each of the above methods, were examined and recorded as follows:

Gram positive: Retained the violet stain with all methods.

Gram variable, generally positive: Decolorized in one or two methods and retained the violet stain by the remaining methods.

Gram variable: Retained the violet stain in about one-half of the preparations.

Gram variable, generally negative: Retained the violet stain in one or two of the methods and decolorized in remainder of cases.

Gram negative: Decolorized in all cases.

In those instances where cultures of various ages were used, if a discrepancy occurred between the various individual preparations due to the age of the culture, the results recorded were taken from the reaction of the majority of the preparations.

Three hundred and sixteen cultures from various sources were stained and studied.

Data.

In many previous studies of the systematic relationships of cocci, the Gram stain has been regarded as an important method for use in dividing the group. It was probably first used in this connection by Heydenreich (1889). In nearly all cases, however, where this particular test has been used for dividing the cocci, only one method of staining has been tried, a fact which has insured more or less constant results. The reactions of the various groups of cocci in the Gram stain have been generally considered to be definite and constant, and in giving such reactions this character has served as a very suitable diagnostic feature in separating so-called natural groups. The discrepancies which occur in using the Gram stain for separating these groups are readily found when more than one procedure is used and comparisons are made between the results of the various methods of

staining. From the variable results (Table 1) as shown when five procedures were used, it can be readily seen that the use of a single

Table

The correlation between the Gram

Gram stain	Number of cultures	Habitat					Chromogenesis				Liquefaction of gelatin		Nitrate reduction		Diastatic action		Oxygen requirement	
		Misc. parasite	Udder	Milk	Misc. saprophyte	Unknown	White	Yellow	Orange	Red	Positive	Negative	Reduced	Not reduced	Positive	Negative	Facultat. anaërobe	Microaerophilic
Gram positive	39	25	2	1	1	10	27	7	5	0	26	13	32	7	3	36	18	21
Gram variable, generally positive	144	96	2	23	13	10	74	42	28	0	120	24	126	18	8	136	59	85
Gram variable	46	19	1	10	11	5	18	24	1	3	42	4	40	6	8	38	31	15
Gram variable, generally negat.	80	47	2	13	8	10	29	34	16	7	69	11	71	9	3	77	43	37
Gram negative	7	0	0	2	4	1	4	3	0	0	3	4	3	4	0	7	3	4

method may lead to far different conclusions than when the results are based upon repeated stainings by various methods. The reactions of the cocci to the Gram stain appeared to be more variable when tested by a variety of methods, and only a few of the cultures studied were found to be constant in their reaction. Of the 316 cultures under observation only 46 gave constant results when stained by the six methods mentioned above, and only 7 of these remained constantly Gram negative.

Another factor which may lead to erroneous conclusions in using the Gram stain is the age of the culture at the time of staining. As stated above, the cultures were all stained at various ages in their growth and the average reaction to the Gram stain of the various ages thus examined was recorded. In general, however, from the standpoint of the age of the culture, it was noted that the organisms lost their ability to retain the violet stain as they became older, and only a few of the strains studied were found to be constantly Gram positive at the end of 30 days. The appearance of the cultures at the end of the 30 day period was very similar, as practically all at this stage presented an uneven stained background, probably similar to the „symplasm" described by Löhnis (1921). This was covered with the characteristic deeply stained granules. During the 12- to 36-hours stage, however, the cultures stained distinctly with each individual unit giving a clear cut and definite picture, indicating that this particular period is preferable for the best results with the Gram stain.

No definite correlation between the Gram reaction and other characters could be found when the results of the staining were considered as positive, negative, and variable, and this lack of relationship shows that the Gram reaction is not adapted for use in separating the

mass-forming cocci into groups of species. Certain parasitic strains, however, show sufficient constancy in their reaction to this test to make

I.
stain and other Characters the Micrococci.

Sugar fermentation						Amino nitrogen assimilation		Ammonia nitrogen assimilation		Ammonia production from				Hemolysis of blood		Maximum H-ion concentration in dextrose broth			Action on milk							Nature of cells	
Dextrose		Lactose		Sucrose						Peptone		Nitrate							Acid			Rennet		Peptonization			
Acid	No acid	Acid	No acid	Acid	No acid	Growth	No growth	Growth	No growth	Positive	Negative	Positive	Negative	No growth	Positive	Negative	pH 5.0 to pH 4.0	pH 7.0 to pH 5.0	pH 8.0 to pH 7.0	No growth	Sufficient to curdle	Not suff. to curdle	No acid	Positive	Negative	Positive	Negative	Regular	Irregular
38	1	29	10	34	5	14	25	19	30	37	2	4	22	13	4	35	33	2	4	0	19	9	11	0	39	8	31	26	13
135	9	123	19	121	23	52	92	51	100	139	5	9	107	28	18	126	116	13	11	4	103	17	24	9	135	40	94	101	43
40	6	36	10	33	13	23	23	25	21	43	3	6	36	4	6	40	26	3	12	5	28	3	15	6	40	20	26	28	18
69	11	65	15	50	30	32	48	35	52	77	3	4	65	42	12	68	68	6	9	7	52	8	20	7	73	27	53	45	35
3	4	3	4	6	1	3	4	4	4	7	0	1	6	0	0	7	3	1	2	1	0	1	6	0	7	0	7	1	6

it useful in their identification, but in no case should reliance be placed upon the results as obtained with a single staining and at least three preparations should be stained before making a decision as to the probable reaction of the culture under question.

Exceptions to this marked variation in staining properties are generally found in Gram stained material taken directly from various lesions and in parasitic organisms freshly isolated. In most of these cases where M. albus, M. aureus and certain closely related species are found, the organisms generally give an almost constant Gram positive picture, a condition which does not hold true when cultures carried for some time on artificial media or cultures from saprophytic sources are examined.

Another interesting point is the fact that the micrococci as a whole regardless of their original habitat have a tendency to be Gram positive. Thirty eight strains of the cultures isolated from saphrophytic habitats tended to be Gram positive as against twentyseven which had a tendency to be Gram negative. A constantly Gram negative micrococcus appears to be relatively rare.

Discussion and Conclusions.

The use of several methods in Gram staining the micrococci indicates that the results obtained by a single method do not always correspond to the results abtained from various other procedures. On the other hand, if one procedure is followed and careful attention is paid to the deatils of the method the results may show a fair amount of constancy, but inasmuch as there is no accepted standard method, it seems advisable to stain the organism in question by various procedures

and draw conclusions from a complication of results. In such cases, however, the technic used should always be stated in conjunction with the results.

There appear to be two kinds of variation in the Gram reaction of this group, the most common being the appearance of Gram negative and Gram positive organisme in the same preparation, even when care is taken to select a field for observation where the individual cells are well scattered and not more than one layer in depth. Such variation appears very common in certain strains in this group and it is evident that such a phenomenon should not be disregarded. The cause whether it be age of the cells, difference in metabolism or other conditions, is not known.

The other type of variation which appears to be relatively rare is a variation from a total Gram positive picture in one preparation to a total Gram negative in another mount, the two being stained with the same or different methods. Such a variation has been observed in many cases, however, and this is especially likely to be found where different observers stain the same organism.

As a whole, the micrococci appear to be very variable in their reaction to the Gram stain and its usefulness as diagnostic test is largely confined to the differentiation of a few species. It is especially useful for freshly isolated cultures from lesions. These appear to show greater constancy.

Bibliography.

Buchanan, R. E., Veterinary Bacteriology, Philadelphia. W. B. Saunders u. Co. 516 pp. 1911. — Heydenreich, Ueber den Bau des Staphylococcus pyogenes aureus. Vrach, 1889. No. 42. (Abst. in Centralbl. f. Bakt. Bd. 5. 1889. S. 59—61.) — Hucker, G. J., A comparison of the various methods of Gram staining. (Preliminary report.) Abst. Bact. 6, p. 2.) — Ders., Studies on the Coccareae II. A study of the General Characters of the Micrococci. (N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bul. No. 100. 1924. 83 pp.) — Hucker, G. J. a. Conn, H. J., Methods of Gram staining. (N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bul. No. 93. 1923. 37 pp.

Nachdruck verboten.

Ein neuer Apparat zur Anaërobenzüchtung.

[Aus dem Staatl. Hygienischen Institut Beuthen (O.-Schl.) (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. v. Lingelsheim).]

Von Dr. **Groetschel.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Die technischen Schwierigkeiten bei der Züchtung anaërober Keime haben dazu geführt, daß in letzter Zeit eine Reihe von Vorschlägen[1]) gemacht worden sind, um die hierzu notwendige Apparatur und die Methoden zu vereinfachen.

Auch wir haben uns die Aufgabe gestellt, einen zweckmäßigen Apparat zu konstruieren. Die Anregung hierzu gab der Direktor unserer Anstalt, Herr Geheimrat v. Lingelsheim. Folgende Bedingungen sollte der Apparat erfüllen:

1) Es muß ein sicher luftdicht schließendes Gehäuse sein. — 2) Die Bedienung muß einfach und handlich mit den in jedem Laboratorium vorhandenen Hilfsmitteln zu bewerkstelligen und der Apparat ohne große Raumverschwendung in jedem Brutschrank bequem unterzubringen sein. — 3) Die Mischung von Kalilauge und Pyrogallol darf erst dann vor sich gehen, wenn das Innere des Apparates luftleer gemacht ist, damit die volle O-resorbierende Wirkung sich nur auf die im praktisch luftleeren Raum noch vorhandenen Reste von Sauerstoff erstrecken kann. — 4) Man muß jederzeit eine Kontrolle über die anaëroben Verhältnisse im Innern des Apparates haben.

Diese Forderungen erfüllt in vollauf befriedigendem Maße der zu beschreibende Apparat (Figur 1 S. 452).

In einem Glaszylinder *A* steht auf etwas erhöhten Füßen ein Plattengestell *C* für 6 Petri-Schalen. An der einen Seite dieses Gestells ist ein U-förmiges Glasrohr *a* befestigt, das, zum Teil mit Quecksilber gefüllt, einen Manometer darstellt. Der Zylinder ist durch einen flachen, aufgeschliffenen Deckel *B* zu verschließen. Einige Zentimeter über dem Boden des Glaszylinders ist eine Oeffnung *c* angebracht, die zur Aufnahme eines passend eingeschliffenen Glasansatzes *D* bestimmt ist. Dieser ist, wie die Figur zeigt, seitlich nach oben gebogen und endet in einer etwa 50 ccm fassenden becherartigen Erweiterung. In der Mitte dieses Ansatzes befinden sich 2 eingeschliffene Glashähne *e* und *d*, von denen der eine, *e*, einen Dreiwegehahn darstellt.

Die eingeschliffenen Glashähne, das in die Oeffnung *c* passende Einsatzstück des Ansatzes *D* und die Berührungsfläche des Deckels *B* mit dem Glaszylinder *A* werden mit einem noch zu beschreibenden Dichtungsfett eingerieben. Die Hähne und das Einsatzstück werden dann durch drehende Bewegung fest an ihren Ort eingefügt. Durch die Klammer *f* wird dann das Einsatzstück befestigt.

Nach Beschickung des Apparates mit Platten und Auflegen des Deckels *B* wird an dem Ansatz des Hahnes *e* mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert bis der Manometer im Innern anzeigt, daß der Apparat praktisch luftleer geworden ist. Unsere Wasserstrahlpumpe leistete diese Arbeit meistens in ca. 10 Min., nur bei geringerem Wasserdruck in etwas längerer Zeit. Der am Hahn *e* befindliche Gummischlauch wird durch einen Quetschhahn verschlossen. Dann füllt man in den Becheransatz

1) Siehe Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92, 93, 94.

bei *D* zunächst Kalilauge in der noch zu erwähnenden Menge und Verdünnung hinein und läßt diese durch entsprechende Stellung der beiden Hähne langsam in den Apparat einfließen. Ein Luftzutritt in das Innere findet hierbei nicht statt. Auf dem gleichen Wege füllt man dann die erforderliche Menge Pyrogallolverdünnung ein. Nach

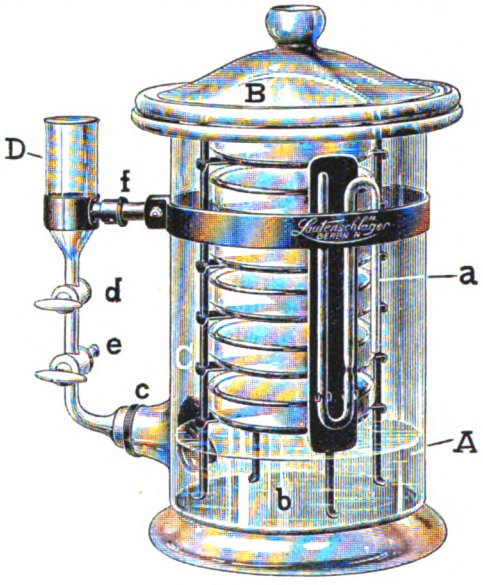


Fig. 1.

Schließung der Hähne kontrolliert man am Manometerstande die Druckverhältnisse im Apparat und kann, wenn die Quecksilberspiegel in gleicher oder annähernd gleicher Höhe stehen, den Apparat nun in jedem Brutschrank bequem unterbringen.

Die Luftdichtigkeit bei unserem Apparat wird gewährleistet durch einen präzisen Schliff der sich berührenden Glasflächen, die vorher mit einem Dichtungsfett überstrichen sind, das man sich leicht herstellen kann durch Zusammenschmelzen von Vaseline, Rindertalg und gelbem Wachs zu gleichen Teilen. Das Fett wird zweckmäßig vorher im Brutschrank etwas angewärmt.

Die Einfüllung der Kalilauge und des Pyrogallols gestaltete sich nach unserer Erfahrung am besten etwa folgendermaßen: Zuerst läßt man 100 ccm 2proz. Kalilauge einfließen und befreit die Glaswandungen von zurückgebliebenen Laugenresten durch Nachfließenlassen von 50 ccm Wasser. Dan füllt man 30 ccm 7proz. Pyrogallollösung ein und spült nochmals mit 50 ccm Wasser nach. Es ist also schließlich im Apparat etwa 230 ccm Flüssigkeit vorhanden, die 2 g KOH und 2,1 g Pyrogallol enthält. Der Flüssigkeitsspiegel steht etwa 1 cm über dem Boden des Gefäßes. [In der Figur (*b*) etwas zu hoch gezeichnet.]

Der mitlaufende Manometer gibt jederzeit Auskunft über die Druckverhältnisse im Apparat. Im unbeschickten Apparat hat sich das Vakuum sowohl bei Zimmertemperatur wie auch bei 37° unverändert gehalten, die Quecksilbersäule blieb mehrere Tage lang konstant auf gleicher Höhe. Ist der Apparat jedoch beschickt, so ist im Inneren reichlich Flüssigkeit vorhanden, die bei dem geringen Druck und der Temperatur von 37° bis zu einem gewissen Grade verdampfen wird.

Diese Wasserdampfatmosphäre im Apparat wird natürlich nicht ohne Einfluß auf die Druckverhältnisse bleiben. In der Tat sehen wir unter diesen Bedingungen auch ein Fallen des Quecksilbers in den ersten 24 Stunden. Die spätestens nach 48 Std. erreichte Höhe wird aber dann konstant erhalten. Daß dieses Fallen des Quecksilbers nicht durch ein Leck verursacht wird, das Luftzutritt gestattet, beweist auch die nicht in schwarz umgeschlagene braune Farbe der Pyrogallol-Kalilaugemischung.

Wir haben den Apparat geprüft durch Züchtungsversuche von Botulinus- und Tetanuskulturen auf Traubenzuckerplatten sowohl wie in Traubenzuckerbouillon. Die Bouillonröhrchen können, wenn das Plattengestell an seinem Platz ist, leicht neben dieses gestellt werden. Die Wachstumsergebnisse waren stets sehr gut.

Einen kleinen Kunstgriff möchten wir noch erwähnen, der sich uns zur Erzielung von Einzelkulturen sehr gut bewährt hat. Bei dem schnellen Erstarrenlassen des Traubenzuckeragars auf Eis stört meistens das sich an der Oberfläche ansammelnde Kondenswasser. Wir ließen daher den Agar schräg in der Platte erstarren. Es sammelt sich dann das Kondenswasser an dem tiefsten Punkte. Der größte Teil der Agaroberfläche aber bleibt trocken.

Ein weiterer Vorteil, den wohl keiner der bisher in Gebrauch befindlichen Apparate aufweisen kann, ist folgender: Sollte es einmal aus irgendeinem Grunde nötig sein, die Pyrogallol-Kalilaugelösung zu erneuern, so kann man bequem, ohne den Apparat öffnen zu müssen, von außen die gewünschte Menge Kalilauge und Pyrogallol zufließen lassen, event. auch einen entstandenen Druckausgleich durch nachträgliches Evakuieren korrigieren. Auch wenn es mit der zur Verfügung stehenden Wasserstrahlpumpe nicht gelingen sollte, die Quecksilberspiegel des Manometers in gleiche Höhe zu bringen, also den Apparat praktisch vollkommen zu evakuieren, so wird die Pyrogallol-Kalilaugemischung, die event. auch stärker gewählt werden kann, trotzdem eine für die Anaërobenzüchtung genügend sauerstoffreie Atmosphäre schaffen, da ja, wie schon erwähnt, die volle O-resorbierende Fähigkeit der Mischung durch die Art der Einfüllung ihre volle Wirkung auf den Sauerstoff im luftverdünnten Raume erstrecken kann.

Die Herstellung und den Vertrieb der Apparate hat die Firma F. & M. Lautenschläger, Berlin, übernommen, die auch in dankenswerter Weise an der Vervollkommnung der Modelle mitgewirkt hat.

Nachdruck verboten.

Beitrag zur Praxis und Theorie der Bakterienschnellfärbung.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Königsberg (Direktor: Prof. Dr. Selter).]

Von **W. Möhrke.**

Bereits im Jahre 1897 hatte Kischensky eine Methode zur Schnellfärbung der Bakterien mit verdünntem Karbolfuchsin (1:10) bzw. dem Pick-Jacobsohnschen Farbgemisch angegeben. Er verreibt das Material auf dem Objektträger in einem Tropfen der Farblösung und erwärmt das Präparat über der Flamme bis zum Eintrocknen. Kischensky empfiehlt einen weiteren Ausbau der Methode, da sie die Möglichkeit geben soll, die Mikroorganismen in verschiedenen Nuancen zu färben und bei einigen Arten sogar Geißelfäden darzustellen.

Bei der Nachprüfung des Verfahrens kam ich zu folgenden Ergebnissen: Man erhält bei Präparaten, die genau nach der angegebenen Vorschrift angefertigt sind, zuweilen recht brauchbare Färbungen, aber nur dann, wenn das Quantum der Farbe und des Materials in bestimmtem Verhältnis zueinander steht. Es gelingt selbst nach vieler Uebung nicht regelmäßig, diesen Proportionalitätsfaktor zu treffen. Wenn sich zu viel Material auf dem Objektträger befindet, sind die Bakterien nur ganz blaß gefärbt; zu viel Farbe gibt recht störende Niederschläge. Die besten Resultate erhält man bei Präparaten von festen Kulturen oder aus Nährflüssigkeiten. Eiter, Sputum etc. läßt sich zwar auch nach dieser Methode färben; die Bakterien heben sich in allen Fällen deutlich von der Umgebung ab, so daß es sehr wohl möglich ist, eine Diagnose zu stellen, indessen ist der Gesamteindruck der Färbung nicht schön. Der Grund erscheint schmutzig; außer gefärbtem Detritus—zellige Bestandteile des Materials werden durch das Erhitzen deformiert — sieht man unregelmäßig verteilte Farbniederschläge. Fuchsinpräparate ergaben mir, auch bei Kulturabstrichen, sehr selten einen ganz niederschlagsfreien Grund. Die Färbung mit dem Pick-Jacobsohnschen Gemisch gibt durchweg schlechte Bilder, so daß sie wohl kaum empfehlenswert ist. Geißeln beweglicher Bakterienarten darzustellen, ist mir trotz vielfach darauf gerichteter Bemühungen nicht gelungen. Die Farbnuance ist bei verschiedenen Bakterienarten nicht gleich; einige färben sich tief dunkel, andere relativ blaß, ein Verhalten, das demjenigen bei ganz kurzer Methylenblaufärbung in gewöhnlicher Weise ähnlich ist. Insbesondere sieht man bei älteren Kulturen, daß ein großer Teil des Materials blaß gefärbt ist, während einzelne Exemplare einen dunkeln Farbton zeigen; bei jungen Kulturen pflegt die Färbung fast durchweg homogen auszufallen.

Ein unbestreitbarer Vorzug der Schnellfärbung besteht in dem Minimum an Zeit, das zur Herstellung eines Präparates gebraucht wird. Mißerfolge sind nicht dem Verfahren als solchem, sondern vielmehr der Technik der Ausführung zur Last zu legen. Ich versuchte deshalb, die Methode in dieser Hinsicht zu verbessern.

Es wurde zunächst eine Reihe von Farbstoffen auf ihre Brauchbarkeit zur Schnellfärbung untersucht, vor allem auch darauf hin, ob sich

Niederschläge bilden. Praktisch brauchbar erwiesen sich nur Methylenblau und Malachitgrün (Chlordoppelzinksalz in $^1/_2$proz. Lösung). Die Niederschläge dieser Farbstoffe werden nämlich in der Hitze unter Alkaliwirkung schneller zersetzt, als der Farbstoff in den Bakterienleibern. Der Grund des Präparates erscheint daher je nach dem Grade der Zerstörung fast vollständig oder ganz klar. Wenig befriedigende Resultate erhielt ich mit den Pararosanilinen (untersucht wurden Gentianaviolett, Methylviolett und Viktoriablau); sie ergeben äußerst intensive Färbung, aber auch starke Niederschläge. Da Loefflers Methylenblau trotz seines Alkaligehaltes noch zu schwach färbt, versuchte ich, die Färbekraft durch stärkere Beizung zu erhöhen. Das Optimum wurde bei einem Alkaligehalt von $^1/_2$ Proz. erreicht. Nun bildet sich bekanntlich in alkalischen Methylenblaulösungen in einiger Zeit, bei stark alkalischen Lösungen schon innerhalb weniger Stunden, Methylenazur (Michaelis). Den Nachteil der außerordentlich geringen Haltbarkeit solcher alkalischer Farblösungen hat neuerdings Schwarz dadurch vermieden, daß er bei der Manson-Färbung Borsäure-Methylenblau und Natronlauge erst kurz vor dem Färben mischt. Ich konnte diese Methode auch mit Vorteil zur Schnellfärbung benutzen. Ueberhaupt erwies sich die getrennte Anwendung von Beize und Farbstoff als zweckmäßig.

Die Technik des Verfahrens gestaltet sich somit folgendermaßen: Das Material wird in einem Tropfen $^1/_2$proz. Kalilauge mit der Oese auf dem Objektträger verrieben. Sodann wird eine Oese Farbstoff (ca. 30 Tropfen gesättigte alkoholische Methylenblaulösung auf 10 ccm Aq. dest., die Lösung soll gerade noch gegen das Licht durchscheinend sein) in den bakterienhaltigen Tropfen eingerieben und das Ganze über die Sparflamme eines Bunsenbrenners gehalten, bis der Tropfen eingetrocknet ist (ca. 4—6 Sek.). Kurz nach dem Eintrocknen wird das Präparat aus der Flamme entfernt und kann nunmehr nach einigen Sekunden der Abkühlung besichtigt werden. Man darf den Objektträger nicht länger in der Flamme lassen, da sonst das Methylenblau in der Hitze unter der Alkaliwirkung auch in den Bakterienleibern zerstört wird. In diesem Falle nehmen die Bakterien einen grauschwarzen Farbton an, werden bei weiterem Erhitzen blaßgrau, bis schließlich alles entfärbt ist.

Die Methode hat mir in dieser Fassung in den meisten Fällen zufriedenstellende Resultate gegeben. Man erhält vielfach sogar prägnantere Bilder, als bei der Färbung nach Loeffler. Es wird Zeit und auch Material erspart, da nur eine ganz geringe Quantität Farbe und kein Fließpapier gebraucht wird.

Auffällig ist die schon von Kischensky hervorgehobene Erscheinung, daß die Mikroorganismen bei der Schnellfärbung vergrößert sind. Nach meinen Beobachtungen erscheinen die Bakterien bei Malachitgrünfärbung immer vergrößert, während sich manche Arten bei Methylenblaufärbung verschieden verhalten. Auch verschiedene Generationen und einzelne Exemplare derselben Art zeigen gelegentlich Unterschiede. Im Vergleich zum Tuschepräparat weisen die in der Hitze gefärbten Bakterien keine Größendifferenz auf. Hieraus ergibt sich, daß die Zellvergrößerung nicht auf einer Deformation durch die Hitze, sondern auf Färbung des Ektoplasmas beruht, zumal andere Degenerationserscheinungen nicht wahrzunehmen sind. Ich schließe mich hier der Auffassung Gutsteins an, der auch die bekannte Vergrößerung der Bakterien im Grampräparat auf Ektoplasmafärbung zurückführt. Be-

rücksichtigt man seine Darlegungen, so würde sich die Größenzunahme der Bakterien bei der Färbung in der Hitze einesteils aus der Affinität gewisser Farbstoffe zum Ektoplasma erklären; andererseits würde die Tatsache, daß die Größenverhältnisse einiger Arten und Zellen unter der Einwirkung mancher Farbstoffe differieren, so zu deuten sein, daß es auch von dem biologischen Zustande der Bakterien abhängt, ob der Effekt der Ektoplasmafärbung eintritt oder nicht.

Das Urteil über die Methode der Schnellfärbung kann dahin zusammengefaßt werden, daß sie zu morphologischen Untersuchungen, bei denen die Größenbestimmung wesentlich ist, wenig geeignet erscheint, daß sie aber in solchen Fällen, in denen schnelle Orientierung erwünscht ist, vielleicht ihren Wert behalten kann.

Literatur.

Kischensky, Ein Verfahren zur schnellen mikroskopischen Untersuchung auf Bakterien in Deckglas- und Objektträgerpräparaten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 21. 1897.) — Michaelis, Das Methylenblau und seine Zersetzungsprodukte. (Ibid. Abt. I. Bd. 29.) — Schwarz, Ueber eine einfache Verbesserung der Mansonfärbung. (Klin. Woch. 1922. Nr. 49.) — Gutstein, Das Ektoplasma der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 94).

Druckfehlerberichtigung.

In dem Aufsatz Alivisatos, Ueber einen mit Formol bereiteten Typhusimpfstoff (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. 95. Heft 1) S. 24, Zeile 9 von unten lies: eigene Kanülen statt einige Kanülen.

Inhalt.

Burgdorf, Richard, Ueber Normalagglutinine für Ruhr- und andere Bazillen. Mit 2 Kurven im Text, S. 417.
Dresel, E. G., Beitrag zur Aktinomycesfrage, S. 412.
Friedland, M., Zur Frage des Einflusses der Strahlenenergie auf das Wachstum der Tuberkelbazillen in vitro, S. 404.
Gózony, L., u. **Surányi, L.,** Reduktionsversuche mit Bakteriophagen, S. 353.
Groetschel, Ein neuer Apparat zur Anaërobenzüchtung. Mit 1 Abbildung im Text, S. 451.
Gutstein, M., Ueber den Kern und den allgemeinen Bau der Bakterien (zugleich ein Beitrag zur Theorie der Lipoidfärbungen). Mit 3 Abbildungen im Text und 1 Tafel, S. 357.
Herrmann, Otto, Tod an Lyssa nach dem Spielen mit einem Schoßhunde, S. 428.
—, —, Die Virulenz der Zerebrospinalflüssigkeit beim wutkranken Menschen und die Vererbung der Wut. Mit 1 Abbildung im Text, S. 429.
—, —, Intrazerebrale oder subdurale Infektion der Kaninchen ohne Assistenten, S. 432.
—, —, Ueber die Dauerhaftigkeit der Immunität gegen Tollwut, S. 433.
Hucker, J., The Gram Staining Properties of the Micrococci, S. 446.
Möhrcke, W., Beitrag zur Praxis und Theorie der Bakterienschnellfärbung, S. 454.
Nikolajewa, E., Antiwutimpfung mittels Karbolvakzine nach der Methode von Prof. Fermi, S. 423.
Sakai, Kikuo, Ueber die B. Paratyphus B-Bazillengruppe bei einer Nahrungsmittelvergiftung, S. 389.
—, —, Studien über die Beziehungen zwischen der Haupt- und Mitagglutination. XII. Mitteilung: Ueber eine neue Unterart von Paratyphus B-Bazillen, S. 438.
Seifert, E., Bakteriologische Blutuntersuchungen nach Operationen, S. 444.
Szilvási, J., u. **Fehér, D.,** Beiträge zur Morphologie der Spirochaeta pallida. Mit 2 Tafeln, S. 436.
Wariszczew, Wladimir, u. **Jakubowitsch, Selma,** Die Besredkasche Tuberkulosereaktion. Erfahrungen aus einer Tuberkulosefürsorgestelle in Moskau. I. Mitteilung, S. 402.
Weigmann, Fritz, Ueber die Häufigkeit der Paratyphus B-Erkrankungen in Schleswig-Holstein. Mit 1 Kurve im Text, S. 396.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5339.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 95 enthaltenen Arbeiten.

Adachi, A., Das morphologische und biologische Verhalten der Diphtheriebakterien in Mischkulturen. 30

Alivisatos, G. P., Ueber einen mit Formol bereiteten Typhusimpfstoff. 20

Aoki, K., u. **Sakai, K.,** Ueber von Hogcholerabazillen einerseits, von Paratyphus A-Bazillen andererseits schwer differenzierbare, in Japan vorkommende Paratyphusbazillen. 152

Baumatz, Szaja, Ueber den Bakteriengehalt des Magens und des Dünndarms vom gesunden Meerschweinchen. 191

Beck, A., u. **Huck, W.,** Enzootische Erkrankungen von Truthühnern und Kanarienvögeln durch Bakterien aus der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie. 330

Becker, Ueber das angebliche Auftreten unspezifischer Ergebnisse bei der Untersuchung von Tuberkuloseseren mit der Bruckschen Reaktion. Bemerkung zu der Arbeit von Isabolinski u. Gitowitsch. 287

Bitter, Ludwig, u. **Buchholz, Leo,** Ueber Milchsäurestreptokokken und Pneumokokken. 38

Böing, W., Untersuchungen über Blutschmarotzer bei einheimischem Vogelwild. 312

Brünn, W., Ueber den Einfluß des Chinins auf das Parasitenbild bei Protosoma. 328

Buchholz, Leo s. **Bitter, Ludwig.**

Burgdorf, Richard, Ueber Normalagglutinine für Ruhr- und andere Bazillen. 417

Buschke u. **Kroó,** Erwiderung auf die Arbeit von J. Tomioka: „Experimenteller Beitrag zur Frage der Immunität bei Recurrens und ihrer Beeinflussung durch die Salvarsantherapie" in Bd. 92. Nr. 2/4 des Centralbl. f. Bakt. etc. 188

Dresel, E. G., Beitrag zur Aktinomycesfrage. 422

Fehér, D. s. **Szilvási, J.**

Fernbach, Hans, u. **Hässler, Erich,** Zur Frage der Antikörperbildung in der Haut. 81

Friedland, M., Zur Frage des Einflusses der Strahlenenergie auf das Wachstum der Tuberkelbazillen in vitro. 404

Gehlen, Walther s. **Knorr, Maximilian.**

Gózony, L., u. **Surányi, L.,** Reduktionsversuche mit Bakteriophagen. 353

Groetschel, Ein neuer Apparat zur Anaërobenzüchtung. 451

Gundel, M., Ueber das Vorkommen von Pneumokokken in der Mundhöhle. 202

Gutstein, M., Das Ektoplasma der Bakterien. III. und IV. Mitteilung: Morphologie und Aufbau des Ektoplasmas der grampositiven Bakterien. Zugleich ein Beitrag zur Theorie der Beizenfärbung. 1

—, —, Ueber den Kern und den allgemeinen Bau der Bakterien (zugleich ein Beitrag zur Theorie der Lipoidfärbungen). 357

Hässler, Erich s. **Fernbach, Hans.**

Herrmann, Otto, Die Virulenz der Zerebrospinalflüssigkeit beim wutkranken Menschen und die Vererbung der Wut. 429

—, —, Experimentelle und natürliche Lyssa recurrens. 69

—, —, Intrazerebrale oder subdurale Infektion der Kaninchen ohne Assistenten. 432

—, —, Tod an Lyssa nach dem Spielen mit einem Schoßhunde. 428

—, —, Ueber die Dauerhaftigkeit der Immunität gegen Tollwut. 433

Herrmann, Otto, Virulenz des Speichels des lyssakranken Menschen und Einfluß anderer Krankheiten auf den Verlauf der Tollwut. 67
Herzberg, Kurt, Experimentelle Untersuchungen über Pocken-Neurolapine. 211
—, —, Vergleichende Untersuchungen über die Konservierung agglutinierender Sera mit Karbolglyzerin, Glyzerin und Yatren. 245
Huck, W. s. **Beck, A.**
Hucker, G. J., A Study of the Characters of Primary Importance in the Differentiation of the Micrococci. 109
—, —, Studies on the Serological Relationships of the Species of Micrococci. 123
—, —, The Gram staining properties of the Micrococci. 446
Ihle, J. E. W., Verzeichnis der Cylicostomum-Arten der Equiden, mit Bemerkungen über einzelne Spezies. 227
Jakubowitsch, Selma s. **Wariszczew, Wladimir.**
Knorr, Maximilian, u. **Gehlen, Walther,** Untersuchungen über einen Erreger der ägyptischen Augenentzündung (Koch-Weekssches Bakterium) und seine Beziehungen zum Pfeifferschen Influenzabazillus. 295
Kollath, Werner, u. **Quast, Gerhard,** Eine vereinfachte Methode für Anaërobenzüchtung. 181
—, —, Vitaminähnliche Substanzen in ihrer Wirkung auf das Wachstum der Influenzabazillen (Baz. Pfeiffer). II. Mitteilung: Die Wachstumsbeeinflussung der Influenzabazillen durch fremde Bakterien und ihre Zusammenhänge mit der Biologie des Influenzabazillus. 158
—, —, Vitaminähnliche Substanzen in ihrer Wirkung auf das Wachstum der Influenzabazillen (Baz. Pfeiffer). III. Mitteilung: Die Rolle des sogenannten X-Faktors für die Biologie der Influenzabazillen. 279
Konrich, Beitrag zur Wirkung von Röntgen- und Ultraviolettstrahlen auf Antikörper in vivo und vitro. 237
Kovács, Nikolaus, Untersuchungen über die Technik der Anaërobenzüchtung. I. Mitteilung. 344
—, —, Zur Technik der subduralen Impfung mit Organemulsionen. 89
Kroó s. **Buschke.**
Lerner, David, Anwendung alkoholfreier Organextrakte zur Ausflockungsreaktion mit Zerebrospinalflüssigkeit. 252
Lode, Alois, Zur Züchtung der Anaëroben. 91
Mejlbo, E., Ein Fall von spontaner Infektion mit Novys Bazillus (Bac. oedematiens Weinberg und Séguin) bei einem Schwein. 339
Möhrcke, W., Beitrag zur Praxis und Theorie der Bakterienschnellfärbung. 454
Mühlmann, M., Ueber Komplementverstärkung. 249
Müller, Reiner, Die Schleimwälle der Paratyphus B-Kolonien. 147
Munter, Hans, Zur Komplementdosierung bei der Wassermannschen Reaktion. 183
Nikolajewa, E., Antiwutimpfung mittels Karbolvakzine nach der Methode von Prof. Fermi. 423
Nodake, R., Einige Versuche zur Gewebsantisepsis bei Staphylokokkeninfektionen. 289
Poppi, Umberto, Die Wirkung des Radiums auf die Kuhpockenlymphe. Vorläufige Mitteilung. 224
Quast, Gerhard s. **Kollath, Werner.**
Sakai, K. s. **Aoki, K.**
Sakai, Kikuo, Studien über die Beziehungen zwischen der Haupt- und Mitagglutination. XII. Mitteilung: Ueber eine neue Unterart von Paratyphus B-Bazillen. 438
—, —, Ueber die B. Paratyphus B-Bazillengruppe bei einer Nahrungsmittelvergiftung. 389
Schmidt, Hans, Die Steigerung der Antikörperbildung durch intravenöse Manganchlorür-Einspritzungen. 74
Schnauder, Fr. s. **Standfuß, R.**
Schuurman, C. J., Der Bakteriophage, ein lebender Organismus. 97
Seifert, E., Bakteriologische Blutuntersuchungen nach Operationen. 444
Sierakowski, Stanislaw, Ueber mit Typhusserum agglutinierende Proteus-Stämme. 137
Sonnenschein, Curt, Zur Kenntnis bakteriophagenähnlicher Erscheinungen. Fleckenartige Aufhellungen in Sproßpilzrasen (Monilia). 257
Standfuß R., u. **Schnauder, Fr.,** Das Kaltauszugverfahren bei der Milzbrandpräzipitation. 61
Surányi, L. s. **Gózony, L.**
Szilvási, J., u. **Fehér, D.,** Beiträge zur Morphologie der Spirochaeta pallida. 436
Troester, C., Ein Vorschlag zur Steigegerung der Leistung des Mikroskops. 94
Wariszczew, Wladimir, u. **Jakubowitsch. Selma,** Die Besredkasche Tuberkulosereaktion. Erfahrungen aus einer Tuberkulosefürsorgestelle in Moskau. I. Mitteilung. 402
Weigmann, Fritz, Ueber die Häufigkeit der Paratyphus B-Erkrankungen in Schleswig-Holstein. 396
Yokota, K., Neue Untersuchungen zur Kenntnis der Bakteriengeißeln. 2. Mitteilung. 261

II. Sachverzeichnis.

Agglutination der Bakterien und Bakteriengeißeln. 261
—, Haupt- und Mit-, Beziehungen zwischen denselben. 438
Agglutinierende Sera, Konservierung derselben. 245
Agglutinine, Normal-, für Ruhr- und andere Bazillen. 417
Aktinomyces, Systematik. 412
Anaërobenzüchtung, Apparat für dieselbe. 451
—, vereinfachte Methode. 181
—, Technik derselben. 91, 344
Antikörperbildung in der Haut. 81
—, Steigerung durch Manganchlorür-Einspritzungen. 74
Antikörper, Wirkung von Röntgenstrahlen auf dieselben. 237
—, Wirkung der Ultraviolettstrahlen auf dieselben. 237
Antisepsis, Gewebs-, bei Staphylokokkeninfektionen. 289
Auerhuhn, Blutparasiten bei demselben. 315
Augenentzündung, ägyptische, Erreger derselben. 295

Bac. Koch-Weeks, Beziehungen zum Influenzabazillus. 295
— oedematiens, Infektion eines Schweines mit demselben. 339
— Pfeiffer s. Influenzabazillen.
— proteus, in Typhusserum agglutinierend. 137
Bakterien, anaërobe, Züchtung derselben. 91, 181
—, anaërobe, Züchtung mittels eines neuen Apparates. 451
Bakterienflora des Magens und des Dünndarms vom gesunden Meerschweinchen. 191
Bakteriengeißeln und Bakterienagglutination. 261
Bakterien, grampositive, Ektoplasma derselben. 1
— aus der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie, Krankheitserreger bei Truthühnern und Kanarienvögeln. 330
—, hämophile, Wachstum in pflanzlichen Nährmitteln. 295
—, Kern und allgemeiner Bau. 357
Bakterienschnellfärbung, Praxis und Theorie derselben. 454
Bakteriophage s. a. d'Herellesches Phänomen.
—, ähnliche Erscheinungen bei Monilia. 257
—, ein lebender Organismus. 97
—, Reduktionsversuche mit demselben. 353
Beizenfärbung, Theorie derselben. 1
Besredkasche Tuberkulosereaktion. 402
Birkhuhn, Blutparasiten bei demselben. 315
Blutparasiten bei einheimischem Vogelwild. 312
Blutuntersuchungen, bakteriologische, nach Operationen. 444
Bruckscbe Tuberkulosereaktion. 287

Chinineinfluß auf das Parasitenbild beim Protosoma. 328
Cylicocercus Ihle. 229
Cylicocyclus Ihle. 232
Cylicodontophorus Ihle. 235
Cylicostephanus Ihle. 234
Cylicostomum-Arten der Equiden, Verzeichnis. 227
Cylicostomum Ihle. 228
Cylicotetrapedon n. subg. 230

Diphtheriebazillen, Verhalten in Mischkulturen. 30
Dünndarm, Bakterienflora beim Meerschweinchen. 191

Ektoplasma der grampositiven Bakterien. 1
Elster, Blutparasiten bei derselben. 317
Exsikkator für Anaërobenzüchtung. 91, 344

Färbung, Beizen-, Theorie derselben. 1
— nach Gram, Verhalten der Mikrokokken. 446
— der Lipoide, Theorie derselben. 357
—, Schnell-, der Bakterien, Praxis und Theorie derselben. 454
Fasan, Blutparasiten bei demselben. 315
Fermi, Wutschutzimpfung nach demselben. 423
Filarien bei einheimischem Vogelwild. 326

Fledermäuse, Blutparasiten bei denselben. 319
Flockungsreaktion m. Zerebrospinalflüssigkeit. 252
Formol zur Typhusimpfstoffbereitung. 20

Geißelagglutination. 261
Geißeln der Bakterien und Bakterienagglutination. 261
Gewebsantisepsis bei Staphylokokkeninfektionen. 289
Glyzerin zur Serumkonservierung. 245
Gram-Färbung, Verhalten der Mikrokokken. 446

Haemoproteus bei einheimischem Vogelwild. 326
Hämorrhagische Septikämie, Bakterien aus der Gruppe derselben. 330
Haut, Antikörperbildung in derselben. 81
d'Herellesches Phänomen s. a. Bakteriophage.
d'Herellesches Phänomen. 97
— —, ähnliche Erscheinungen bei Monilia. 257
— —, Reduktionsversuche mit Bakteriophagen. 353
Hirnimpfung, Technik derselben. 89
Hund, Wutübertragung auf den Menschen durch denselben. 428

Impfung, subdurale, Technik derselben. 89
Influenzabazillen, Beziehungen zum Bac. Koch-Weeks. 295
—, Wachstumsbeeinflussung durch fremde Bakterien. 158
—, Wirkung vitaminähnlicher Substanzen auf das Wachstum derselben. 158, 279

Kanarienvögel, enzootische Erkrankungen durch Bakterien aus der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie. 330
Karbolglyzerin zur Serumkonservierung. 245
Kartoffelnährböden, Wachstum hämophiler Bakterien auf denselben. 295
Kokken, Verhalten gegenüber der Gram-Färbung. 446
Komplementdosierung bei der Wassermann-Reaktion. 183
Komplement, Verstärkung desselben. 249

Lamellirostres, Blutparasiten bei denselben. 318
Leukozytozoon bei einheimischem Vogelwild. 321
Lipoidfärbungen, Theorie derselben 357
Lyssa s. a. Wut.
— recurrens, experimentelle und natürliche. 69

Magen, Bakterienflora beim Meerschweinchen. 191
Manganchlorüreinspritzung zur Steigerung der Antikörperbildung. 74
Meerschweinchen, Bakterienflora d. Magens und Dünndarms. 191
Mikrokokken, Differenzierung. 109, 123. 446
Mikroskop, Leistungssteigerung desselben. 94
Milchsäurestreptokokken und Pneumokokken, Differenzierung. 38
Milzbrandpräzipitation, Kaltauszugverfahren bei derselben. 61
Mischkulturen, Verhalten von Diphtheriebazillen in denselben. 30
Monilia, bakteriophagenähnliche Erscheinungen bei derselben. 257
Mundhöhle, Pneumokokken in derselben. 202

Nährböden, pflanzliche, Wachstum hämophiler Bakterien in denselben. 295
Nahrungsmittelvergiftung, Paratyphus B-Bazillengruppe, Ursache derselben. 389
Normalagglutinine s. Agglutinine, Normal-.

Operationen, Blutuntersuchungen, bakteriologische, nach denselben. 444
Organemulsionen, Herstellung derselben. 89

Paracholera bei Truthühnern u. Kanarienvögeln. 330
Paratyphusbazillen, schwer differenzierbare, in Japan vorkommend. 152
Paratyphus B-Bazillengruppe, Nahrungsmittelvergiftung, Ursache derselben. 389
— B-Bazillen, neue Unterart derselben. 438
— B-Erkrankungen in Schleswig-Holstein, Häufigkeit derselben. 396
— B-Kolonien, Schleimwälle bei denselben. 147
Paratyphusimpfstoff, Bereitung mittels Formol. 20
Pneumokokken und Milchsäurestreptokokken, Differenzierung. 38
—, Vorkommen in der Mundhöhle. 202
Pockenlymphe, Radiumwirkung auf dieselbe. 224
Pockenneurolapine, experimentelle Untersuchungen. 211
Präzipitation, Milzbrand-, Kaltauszugverfahren bei derselben. 61
Proteosoma praecox bei einheimischem Vogelwild. 325
Protosoma, Chinineinfluß auf das Parasitenbild bei demselben. 328

Radium, Wirkung auf Pockenlymphe. 224
Raubvögel, Blutparasiten bei denselben, 317

Rebhuhn, Blutparasiten bei demselben. 314
Röntgenstrahlen, Wirkung auf Antikörper. 237
Ruhrbazillen, Normalagglutinine für dieselben. 417

Schleimwälle der Paratyphus B-Kolonien. 147
Schleswig-Holstein, Paratyphus B-Erkrankungen, Häufigkeit derselben. 396
Schwein, Infektion mit Bac. oedematiens. 339
Serum, agglutinierendes, Konservierung desselben. 245
Speichel, Virulenz desselben bei Wut. 67
Spirochaeta pallida, Morphologie derselben. 436
Staphylokokken, Differenzierung. 109, 123
Staphylokokkeninfektionen, Gewebsantisepsis bei denselben. 289
Strahlenenergie, Wirkung auf das Tuberkelbazillenwachstum in vitro. 404
Streptococcus acidi lactici, Differenzierung. 38
— lacticus-Gruppe, Differenzierung. 38
Syphilis, Flockungsreaktion mit Zerebrospinalflüssigkeit. 252
—, Wassermann-Reaktion. 183

Tauben, Blutparasiten bei denselben. 316
Tuberkelbazillen, Wirkung der Strahlenenergie auf das Wachstum derselben in vitro. 404
Tuberkulosereaktion nach Besredka. 402
— — nach Bruck. 287
Truthühner, enzootische Erkrankungen durch Bakterien aus der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie. 330
Trypanosomen bei einheimischem Vogelwild. 319
Typhusbazillen, Beziehungen der Geißeln zur Agglutination derselben. 261
Typhusimpfstoffbereitung mittels Formol. 20
Typhusserum, Proteusstämme agglutinierend. 137

Ultraviolettstrahlen, Wirkung auf Antikörper. 237

Vitaminähnliche Substanzen, Wirkung auf das Wachstum von Influenzabazillen. 158, 279
Vogelwild, einheimisches, Blutschmarotzer bei demselben. 312

Wassermann-Reaktion, Komplementdosierung bei derselben. 183
Wut, Einfluß anderer Krankheiten auf den Verlauf derselben. 67
—, Immunitätsdauer bei derselben. 433
—, Infektion der Kaninchen, intrazerebrale oder subdurale. 432
—, Infektion durch einen Schoßhund. 428
—, Schutzimpfung nach Fermi. 423
—, Vererbung derselben. 429
—, Virulenz des Speichels bei derselben. 67
—, Virulenz der Zerebrospinalflüssigkeit bei derselben. 429
Wutanfälle, periodische. 69

Yatren zur Serumkonservierung. 245

Zerebrospinalflüssigkeit, Flockungsreaktion mit derselben. 252
—, Virulenz bei Wut. 429

III. Verzeichnis der Abbildungen.

Anaërobenzüchtung. 182
—, Apparat, neuer, für dieselbe. 451
—, Exsikkator für dieselbe. 92, 350

Bakterien, Ektoplasma derselben (Taf.). 19
Bakteriengeißeln und Bakterienagglutination. (Taf.). 278
Bakterien, Kern und allgemeiner Bau. 361, 382, 385, (Taf.) 388
Bakteriophagen-ähnliche Erscheinungen bei Monilia. (Taf.). 260
Blutparasiten bei einheimischem Vogelwild. (Taf. I, II). 327

Cylicostomum bidentatum. 231

Influenzabazillen, Wirkung vitaminähnlicher Substanzen auf das Wachstum derselben. (Taf. I, II). 180
—, Wirkung vitaminähnlicher Substanzen auf das Wachstum derselben. 284
Kanarienvogel, Nekroseherde aus Leber und Milz. 334, 335
Paratyphus B-Kolonien, Schleimwallbildung. 148
Reibschale zur sterilen Verarbeitung von Organen. 90
Spirochaeta pallida, Morphologie derselben. (Taf. I, II). 436
Wut, Virulenz der Zerebrospinalflüssigkeit. 429

CE
Ser. 2a
V. 95
No. 7-8

Centralblatt

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung: Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Prof. Dr. R. Abel, Geh. Obermed.-Rat, Jena
Prof. Dr. M. Braun, Geh. Reg.-Rat. Königsberg i. Pr.
Prof. Dr. R. Pfeiffer, Geh. Med.-Rat, Breslau

herausgegeben von

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Uhlworm, Bamberg, Kunigundendamm 61 II
Präsident Dr. A. Weber, Dresden-N. 6, Wilhelmplatz 4 II

und

Prof. Dr. E. Gildemeister, Ob.-Reg.-Rat, Berlin-Lichterfelde W, Victoriastr. 7

Verlag von Gustav Fischer in Jena

95. Band | Jena, 1. August 1925 | Heft 7/8

— Jeder Band umfaßt 8 Hefte, die in zwangloser Folge erscheinen. —

SEP 13 1925
LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS

PAUL ALTMANN

Luisenstraße 47 Ecke Schumannstr. **BERLIN NW 6** Luisenstraße 47 Ecke Schumannstr.

Fabrik und Lager

aller Apparate und Utensilien für Chemie, Bakteriologie, Mikroskopie und Hygiene

Agglutinoskop
(Kuhn-Woithe)

Autoklaven :: Brutschränke :: Sterilisatoren :: Centrifugen Schüttelapparate :: Serodiagnostische Apparate :: Wasseruntersuchungsapparate :: Vollständige Einrichtungen von Laboratorien :: Große Bruträume, transportabel, für Bereitung von Massenkulturen :: **Neue Abfüllapparate für Serum- und Impfkulturen :: Neue Seitz-Filter** zur keimfreien Filtration von Bakterienkulturen usw.

Verlag von Gustav Fischer in Jena

Das Tatauierungswesen im heutigen Europa

Von

Professor Dr. med. **Erhard Riecke**
Direktor der Dermatologischen Universitätsklinik in Göttingen

Mit 1 Abbildung im Text und 94 Lichtbildern auf 24 Tafeln
40 S. und 8 Blatt Tafelerklärungen. Form. 30½ × 23 cm. 1925
Rmk 24.—

Inhalt: Einleitung. Ueber Wesen, Bestand und Biologie der Tatauierung Histologie. Wer tatauiert sich heutzutage in europäischen Kulturländern? Wo an der Haut tatauiert sich der Europäer? Was tatauiert sich der Europäer? Warum tatauiert sich der Europäer? Ueber die Beseitigungen von Tatauierungen.

Die Tatauierung (Tätowierung) ist ein Volksbrauch, der auch in den europäischen Kulturstaaten verbreitet ist. Seit einer ganzen Reihe von Jahren hat der Verf. diesen Dingen seine Aufmerksamkeit geschenkt, und, soweit es angängig war, Lichtbilder gefertigt. In den Kriegsjahren hat er in Frankreich und Belgien ganz besonders zur Vervollständigung des einschlägigen Materials Gelegenheit gehabt und aus den Hunderten von Tatauierungen entstand dieses Werk. Auf 24 Tafeln sind 94 vorzügliche Lichtbilder vereinigt, die die Formen der Tatauierungen zeigen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

UNIVERSITY OF ILLINOIS-URBANA
589.05CE C001
ZENTRALBLATT FUR BAKTERIOLOGIE, PARASITE
95 1925
3 0112 009814978